

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



| | | |
|--|--|---|
| (51) 国際特許分類6 C12N 15/86, 15/12, 5/10 | A1 | (11) 国際公開番号 WO97/18318 (43) 国際公開日 1997年5月22日(22.05.97) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP96/03254 | | |
| (22) 国際出願日 1996年11月7日(07.11.96) | | |
| (30) 優先権データ 特願平7/294382 特願平8/51847 | 1995年11月13日(13.11.95) 1996年3月8日(08.03.96) | JP JP |
| (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP) | | 小山信人(KOYAMA, Nobuto)[JP/JP] 〒611 京都府宇治市小倉町久保96 Kyoto, (JP) 橋野仁一(HASHINO, Kimikazu)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市明野町27-3 Osaka, (JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒611 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP) |
| (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 浅田起代蔵(ASADA, Kiyozo)[JP/JP] 〒520-33 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘3-20-9 Shiga, (JP) 上森隆司(UEMORI, Takashi)[JP/JP] 〒520-21 滋賀県大津市大江3丁目1-16 シャルマンコーポ第2瀬田709号 Shiga, (JP) 上野高嗣(UENO, Takashi)[JP/JP] 〒525 滋賀県草津市西瀬川2丁目12-1 ハーモパレス草津609号 Shiga, (JP) | | (74) 代理人 弁理士 青山 葵, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SK, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |

(54)Title: METHOD FOR GENE INTRODUCTION INTO TARGET CELLS BY RETROVIRUS

(54)発明の名称 レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入方法

(57) Abstract

A method for elevating the gene introduction efficiency into target cells by a retrovirus which comprises infecting the target cells with the retrovirus in the presence of a mixture of an effective amount of a functional substance having a retrovirus-binding site with an effective amount of another functional substance having a target cell-binding site, or in the presence of an effective amount of a functional substance having both of these binding sites in a single molecule. The functional substances are optionally immobilized on beads, etc. This method is usable in, for example, gene therapy.

(57) 要約

レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法に
関し、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方
法において、レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、標
的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質との混合物の存在下、ま
たはこれらの結合部位を同一分子中に持つ有効量の機能性物質の存在下で
標的細胞をレトロウイルスで感染させる。機能性物質は非固定でも、ビ
ーズ等に固定されていてもよく、この方法は、例えば、遺伝子治療に有用で
ある。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|-----------|----|-------------|-----|-------------|-----|------------|
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LR | リベリア | RU | ロシア連邦 |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LS | レソト | SDE | スエーデン |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LT | リトアニア | SEG | スウェーデン |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LU | ルクセンブルグ | SG | シンガポール |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LV | ラトヴィア | SIK | スロヴェニア |
| BB | バルバドス | GB | イギリス | MC | モナコ | SK | スロバキア共和国 |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | MD | モルドバ | SN | セネガル |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MG | マダガスカル | SZ | スウェーデン |
| BG | ブルガリア | GN | ギニア | MK | マケドニア旧ユーゴスラ | TG | チャード |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | ML | マリ | TG | トーゴ |
| BR | ブラジル | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | TJ | タジキスタン |
| BY | ベラルーシ | IE | アイルランド | MR | モーリタニア | TM | トルコメニスタン |
| CA | カナダ | IS | イスランド | MW | マラウイ | TR | トリニダード・トバゴ |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IT | イタリー | MX | メキシコ | TT | ウクライナ |
| CG | コンゴ | JP | 日本 | NE | ニジェール | UA | ウガンダ |
| CH | スイス | KE | ケニア | NL | オランダ | US | 米国 |
| CI | コート・ジボアール | KG | キルギスタン | NO | ノルウェー | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| CM | カメルーン | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NZ | ニュージーランド | VN | ヴィエトナム |
| CN | 中国 | KR | 大韓民国 | PPL | ポーランド | YU | ユーゴスラビア |
| CZ | チェコ共和国 | KZ | カザフスタン | PT | ポルトガル | | |
| DE | ドイツ | LI | リヒテンシュタイン | RO | ルーマニア | | |
| DK | デンマーク | LK | スリランカ | | | | |

明 細 書

レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入方法

発明の分野

本発明は、医学、細胞工学、遺伝子工学、発生工学などの分野において標的細胞への遺伝子導入効率を向上させ、標的細胞の形質転換を効率良く行うことを可能にする方法およびそれに関連する一連の技術に関する。

従来の技術

多数のヒト疾患についてその機構が解明され、また、組換えDNA技術、および細胞への遺伝子導入技術が急速に進歩したことより、近年、重篤な遺伝病を治療するための体細胞遺伝子治療法のプロトコールの開発が進められている。また、最近では遺伝病のみならずAIDSのようなウイルス感染症やガンの治療にも遺伝子治療を適用しようという試みがなされている。

これまでに米国食品医薬品局（FDA）が承認したヒトでの遺伝子導入試験の大部分は組換えレトロウイルスベクターを用いて細胞への遺伝子導入を行うものである。レトロウイルスベクターは目的の外来遺伝子を細胞内に効率的に導入し、その染色体DNA中に安定に組み込むので、特に長期にわたる遺伝子発現が望まれる遺伝子治療にとって好ましい遺伝子導入手段である。該ベクターは遺伝子導入された生物に悪影響を与えないよう様々な工夫が施されている。例えば、遺伝子導入に用いられたベクター自体が細胞内で複製を行い、無制限な感染（遺伝子導入）を繰り返さないよう、ベクター中の複製機能は欠損させてある。これらのベクター（複製

能欠損レトロウイルスベクター) は自己複製できないため、一般的にはレトロウイルス産生細胞(パッケージング細胞)を使用してウイルス粒子に包まれたレトロウイルスベクターを調製する。

一方、骨髄細胞はインービトロ (in vitro) での取り扱いが可能なこと、および自己複製能を有する造血幹細胞を含有していることから、体細胞遺伝子治療法の良好な標的細胞である。また、臍帯血液も造血幹細胞を含む多数の原始前駆細胞を含有していることがこれまでに証明されている。これらの標的細胞に遺伝子を導入して生体に移植する遺伝子治療を行うことにより、導入された遺伝子が血液細胞中で長期にわたり発現され、疾病を生涯治癒することができる。

しかし、多数のグループによって研究が進められているにもかかわらず、造血幹細胞は高効率の遺伝子導入の難しい細胞の一つである。これまで、マウスやその他の動物の造血幹細胞に関して最も効率の良い遺伝子導入のプロトコールは、造血幹細胞をレトロウイルス産生細胞とともに共培養するという方法であったが、安全性についての懸念から、ヒトにおける臨床的な遺伝子治療法には、レトロウイルス産生細胞の混入の危険性の低い無細胞系での遺伝子導入が望まれている。残念ながら、レトロウイルス産生細胞との共培養を行わずに造血幹細胞に効率的に遺伝子を導入することは容易ではない。

最近、細胞外マトリックスの成分であるフィブロネクチンや、そのフラグメントが、単独でレトロウイルスによる細胞への遺伝子導入効率を向上させることが報告されている (J. Clin. Invest.、第93巻、第1451～1457頁、1994年、Blood、第88巻、第855～862頁、1996年)。また、遺伝子工学的に生産されたフィブロネクチンフラグメントも同様の性質を有しており、これをを利用して造血幹細胞に効率よく外来遺伝子を導入させることができます。

可能であることも示された (WO 95/26200号)。こうしたフィブロネクチンによる遺伝子導入効率の向上には、フィブロネクチン中のヘパリン結合領域と、レトロウイルスとの結合が関与していることが示唆されている。これらのフィブロネクチンや、フィブロネクチンフラグメントを利用した方法は、全てフィブロネクチンや、そのフラグメントを固定化したプレート中で細胞にレトロウイルスベクターを感染させるものである。

発明の目的

上記のフィブロネクチンや、フィブロネクチンフラグメントを利用した遺伝子導入法は、レトロウイルス結合部位と標的細胞部位を同一の分子上有するフィブロネクチンあるいはそのフラグメント分子によって達成されると考えられている (Nature Medicine、第2巻、第876～872頁、1996年)。したがって、上記の方法を応用して種々の標的細胞に効率良く遺伝子を導入するためには、細胞に応じて一つの分子上有するウイルスと細胞の結合部位を有する機能性物質を作製する必要があり、普遍的な遺伝子導入法として利用するためには、なお問題を有している。

また、上記の方法は、レトロウイルス感染時に標的細胞の培養に使用するプレートの表面にフィブロネクチンあるいはフィブロネクチンフラグメントを固定化することによって達成されているが、プレートへの固定化は煩雑な操作を要し、簡便な遺伝子導入法とは言えない。

さらに、上記の方法に使用される機能性物質は、レトロウイルス結合部位としてフィブロネクチン由来のヘパリン結合領域を含むものに限られている。このため、これ以外のレトロウイルス結合物質を見いだすことにより、さらに優れた遺伝子導入方法を開発する可能性がある。

本発明は、このような問題を解決し、より簡便かつ効率のよい遺伝子導

入法を提供すべくなされたものである。

発明の概要

本発明者らは、フィブロネクチンあるいはそのフラグメントに代表される機能性物質によるレトロウイルス感染促進作用が、レトロウイルス結合部位を有する領域と、細胞結合部位を有する領域とが同一分子上に存在しない場合においても認められることを見いだした。すなわち、レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入の標的細胞への結合部位を有する機能性物質とを混合して使用することにより、標的細胞へのレトロウイルスによる遺伝子導入効率を向上させることができることを見いだした。

また、本発明者らは、機能性物質によるレトロウイルス感染促進作用が、機能性物質をプレートの表面に固定化しない状態であっても認められることも見いだした。また、機能性物質を固定化したビーズの存在下にレトロウイルスを標的細胞に接触させた場合にも、標的細胞への遺伝子導入効率が向上されることを見いだした。

本発明者らは、また、フィブロネクチン由来のヘパリン結合領域を含まないレトロウイルス結合性物質を見いだし、該物質およびそれらの誘導体がレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入に有用であることも見いだした。さらに、本発明者らは、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入に有用な機能性物質を創成することに成功し、本発明を完成させることに至った。

かくして、本発明の第1の発明はレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法に関し、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入において、レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性

物質と、標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質との混合物の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることを特徴とする。

本発明の第1の発明のレトロウイルス結合部位を有する機能性物質は特に限定するものではなく、例えば、フィブロネクチンのヘパリン－II結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である。また、標的細胞結合部位を有する機能性物質とは、標的細胞に結合するリガンドを含有する物質であればよい。当該リガンドとしては、細胞接着性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗体、糖鎖、炭水化物または標的細胞の代謝物等があり、細胞接着性のタンパク質としては、例えば、フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドがある。当該フィブロネクチンの細胞結合領域としては、VLA-5および／またはVLA-4への結合領域ポリペプチドがある。また、他のリガンドとしてはエリスロポエチンが挙げられる。

第1の発明に使用する機能性物質は非固定化でも、固定化されていてもよく、特にビーズに固定化することにより、簡便に使用できる。また、標的細胞に結合部位を有する機能性物質として、標的細胞に特異的なリガンドを選択することにより、第1の発明により、簡便に標的細胞への遺伝子導入のターゲッティングが可能になる。

上記のごとく、従来のWO 95/26200号や、Nature Medicineに開示される方法においては、レトロウイルスと標的細胞が、レトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位とを同一分子上に有する機能性物質上で共配置することが、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる機構において必須とされている。しかしながら、本発明により、レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質との混合物の存在下でレトロウイルス

による標的細胞への遺伝子導入を行うと、遺伝子導入効率が向上する。

本発明の第2の発明は、レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質との混合物を含有するレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入に使用する標的細胞の培養培地に関する。

第2の発明の培地を使用することにより、第1の発明が簡便に実施することができる。

本発明の第3の発明はレトロウイルスの配置方法に関し、レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質との混合物と接触したレトロウイルスを含有する培地を、インキュベートすることを特徴とする。

本発明の第4の発明は、標的細胞内へのレトロウイルス介在遺伝子導入の実施に使用するためのキットであって、

(a) レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質および／または標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質、

(b) レトロウイルスと接触した標的細胞をインキュベートするための人工基質、および

(c) 上記標的細胞を予備刺激するための標的細胞増殖因子、を含んでなることを特徴とするキットに関する。

第4の発明のキットを使用することにより、第1および第3の態様をそれぞれ簡便に行うことができる。

本発明の第5の発明は、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法に関し、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入に際し、標的細胞結合部位と、線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位またはそれらと機能的な同等

物とを同一分子上有する有効量の機能性物質の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることを特徴とするレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入を向上させる方法である。

上記のWO 95/26200号公報およびNature Medicineに記載される従来の方法においては、最も効率よく、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入を向上させる方法に使用できる物質として、フィブロネクチンのフラグメントが開示されている。しかしながら、フィブロネクチンフラグメント以外の機能性物質でどのような機能性物質が効率よくレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入を向上させる方法に使用できるかについては、具体的な開示はない。特に、この従来の方法において、レトロウイルス結合部位とは、フィブロネクチンのリピート12-14が開示されているのみである。

本発明者らは、このフィブロネクチンのリピート12-14とは、構造的相関の全くない、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジン等が、意外にも、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入を向上させる方法において有効に使用できることを見いだした。したがって、これらの物質と機能的な同等物、すなわち、これらの物質と機能的に同等のレトロウイルス結合部位を有し、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる能力を有する物質は、いずれも第5の発明において使用することができる。

第5の発明において、標的細胞結合部位には、標的細胞に結合するリガンドを含有する物質が使用でき、これはレトロウイルス結合部位と結合している。

当該リガンドとしては、例えば、細胞接着性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗体、糖鎖、炭水化物または標的細胞の代謝物等が挙げら

れる。細胞接着性のタンパク質の一例としては、フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドが挙げられ、例えば、VLA-5および／またはVLA-4への結合領域ポリペプチドが使用できる。他のリガンドとしては、エリスロポエチンが挙げられる。

第5の発明において、レトロウイルス結合部位として供される線維芽細胞増殖因子としては、例えば、配列表の配列番号3で表される線維芽細胞増殖因子、該因子の機能的同等物や、該因子または該因子の機能的同等物を含有するポリペプチドから選択される線維芽細胞増殖因子がある。

これらの機能性物質としては、例えば、配列表の配列番号4または5で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。

第5の発明において、レトロウイルス結合部位として供されるコラーゲンとしては、例えば、V型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメント、該フラグメントの機能的同等物や、該フラグメントまたは該フラグメントの機能的同等物を含有するポリペプチドから選択されるコラーゲンがある。また、当該フラグメントとしては、例えば、配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するフラグメントが挙げられる。

これらの機能性物質としては、配列表の配列番号7または8で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。

第5の発明において、レトロウイルス結合部位として供されるポリリジン(polylysine)とはL-リジン(lysine)の重合体であって、例えば、市販のポリリジンより適当な重合度のポリリジンを選択し使用することができる。

線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、またはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位が同時に標的細胞結合部位を有する場合においては、この線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結

合部位を有する有効量の機能性物質の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることによって、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させることができる。また、標的細胞が接着性細胞の場合には、該機能性物質にレトロウイルスと標的細胞とがそれぞれ結合、接着し、この線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることによって、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させることができる。

なお、配列表の配列番号1で表されるポリペプチド（以下、H-271と称す）が同時に標的細胞結合部位を有する場合、すなわち、標的細胞が該ポリペプチド、H-271、に結合性を有する場合においても、有効量のこのポリペプチドの存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることによって、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させることも見いだした。

すなわち、上記Nature Medicineによれば、フィブロネクチンのリピート12-14がレトロウイルス結合部位と開示されているが、本発明者らは、意外にも、このH-271が標的細胞の種類によっては、標的細胞結合部位として、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率の向上に有效地に機能することを見いだした。また、標的細胞が接着性細胞の場合にも、このポリペプチドにレトロウイルス、標的細胞がそれぞれ結合、接着し、有効量のこのポリペプチドの存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることによって、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させることも見いだした。

第5の発明において当該機能性物質は固定化されていてもよく、固定化されていなくてもよいが、標的細胞が接着性細胞の場合は、固定化して用

いるのが効率の良い方法である。

本発明の第6の発明は、標的細胞結合部位と、線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位またはそれらと機能的な同等物とを同一分子上に有する有効量の機能性物を含有するレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入に使用する標的細胞の培養培地に関する。

本発明の第7の発明は、上記した線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と接触したレトロウイルスを含有する培地をインキュベートするレトロウイルスの配置方法に関する。これらの機能性物質は、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入を向上させる方法において、レトロウイルスの配置に有效地に使用できる。

また、本発明のレトロウイルスの配置方法では、標的細胞結合部位と線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位またはそれらと機能的な同等物とを同一分子上に有する有効量の機能性物質と接触したレトロウイルスを含有する培地をインキュベートすることも包含する。

本発明の第8の発明は、標的細胞内へのレトロウイルス介在遺伝子導入の実施に使用するためのキットであって、

(a) 標的細胞結合部位と、線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位またはそれらと機能的な同等物とを同一分子上に有する有効量の機能性物質、

(b) レトロウイルスと接触した標的細胞をインキュベートするための人工基質、および

(c) 上記標的細胞を予備刺激するための標的細胞増殖因子、

を含んでなることを特徴とするキットに関する。

これらの第1および第5の方法の発明、第2および第6の培地の発明、第3および第7の方法の発明ならびに第4および第8のキットの発明、いずれにおいても、機能性物質のビーズ固定化物が好適に使用できる。

本発明の第9の発明は、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法に関し、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入において、実質的に純粋なフィブロネクチン、実質的に純粋なフィブロネクチンフラグメントおよびそれらの混合物より選択される有効量のビーズに固定化された機能性物質の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることを特徴とする。

本発明の第10の発明もレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法に関し、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入において、実質的に純粋なフィブロネクチン、実質的に純粋なフィブロネクチンフラグメントおよびそれらの混合物より選択される有効量の固定化されていない機能性物質の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることを特徴とする。

上記のWO 95/26200号およびNature Medicineの方法においては、レトロウイルスと標的細胞が、レトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位を同一分子上有する機能性物質上で共配置することが、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる機構において必須である。この方法において、レトロウイルスと標的細胞を、レトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位を同一分子上有する機能性物質上で共配置させるには、レトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位を同一分子上有する機能性物質を培養基に固定化させることによりはじめて可能になる。

しかしながら、本発明によれば、これらの実質的に純粹なフィブロネクチン、実質的に純粹なフィブロネクチンフラグメントおよびそれらの混合物を用いる場合においても、意外にも、上記レトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位を同一分子上有する機能性物質上が培養基に固定化された状態でなくても、効率よく、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率が向上する。

第1、第5、第9および第10の発明において、標的細胞としては、例えば、幹細胞 (stem cells)、造血細胞、非接着性低密度単核細胞、接着性細胞、骨髓細胞、造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血液細胞、胎児性造血幹細胞、胚形成幹細胞、胚細胞、プライモディアル・ジャーム・セル (primordial germ cell)、卵母細胞、卵原細胞、卵子、精母細胞、精子、CD34+細胞、CD-Kit+細胞、多能性造血前駆細胞、単能性造血前駆細胞、赤血球系前駆細胞、リンパ球母細胞、成熟血球、リンパ球、B細胞、T細胞、線維芽細胞、神経芽細胞、神経細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝細胞、筋芽細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、ガン細胞、骨髓腫細胞および白血病細胞から選択される細胞が使用できる。

第1、第3、第5、第7、第9および第10の発明において、レトロウイルスとしては、外来遺伝子を含有するレトロウイルスを使用することができ、また、レトロウイルスとしては、例えば、組換え体レトロウイルスベクターが使用できる。さらに、レトロウイルスとしては、例えば、複製能を欠損した組換え体レトロウイルスベクターを使用することができる。

本発明の第11の発明は、上記の第1、第5、第9および第10の発明で得られる遺伝子導入細胞に関する。

本発明の第12の発明は、第11の発明の遺伝子導入細胞を脊椎動物に移植する細胞移植方法に関する。

本発明の第13の発明は、配列表の配列番号13で表されるレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドまたはその機能的同等物に関する。

本発明の第14の発明は、第13の発明のポリペプチドをコードする遺伝子に関する。かかる遺伝子の例としては、配列表の配列番号17で表される遺伝子または厳密な条件下で該遺伝子にハイブリダイズし、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドをコードする遺伝子が挙げられる。

上記WO 95/26200号およびNature Medicineの方法において、最も効率よく遺伝子導入に使用できるのはCH-296である。一方、本発明者らは、VLA-5結合部位、VLA-4結合部位を有さない、上記ポリペプチドが意外にも、本発明に使用できることを見いだした。

本発明の第15の発明は、配列表の配列番号30で表されるレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドまたはその機能的同等物に関する。

本発明の第16の発明は、第15の発明のポリペプチドをコードする遺伝子に関する。かかる遺伝子の例としては、配列表の配列番号33で表される遺伝子または厳密な条件下で該遺伝子にハイブリダイズし、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドをコードする遺伝子が挙げられる。

本発明の第17の発明は配列表の配列番号5で表されるレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドまたはその機能的同等物に関する。

本発明の第18の発明は、第17の発明のポリペプチドをコードする遺伝子に関する。かかる遺伝子の例としては、配列表の配列番号26で表さ

れる遺伝子または厳密な条件下で該遺伝子にハイブリダイズし、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドをコードする遺伝子がある。

発明の詳細な説明

本発明の遺伝子導入方法には、通常、組換えレトロウイルスベクターが使用され、特に、複製能欠損組換えレトロウイルスベクターが好適である。該ベクターは感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させており、非病原性である。これらのベクターは脊椎動物細胞、特に、哺乳動物細胞のような宿主細胞に侵入し、その染色体DNA中にベクターに挿入された外来遺伝子を安定に組み込むことができる。

本発明では、細胞に導入しようとする外来遺伝子は適当なプロモーター、例えば、レトロウイルスベクター中に存在するLTRのプロモーターや外来プロモーターの制御下に、組換えレトロウイルスベクター内に挿入して使用することができる。また、外来遺伝子の転写を達成するためにはプロモーターおよび転写開始部位と共同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列がベクター内に存在していてもよい。さらに、好ましくは、導入された遺伝子はその下流にターミネーター配列を含有することができる。導入される外来遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子が、ライゲーションや当該技術分野で公知の他の手段によって結合されたものであってもよい。

レトロウイルスベクターに挿入される外来遺伝子は、細胞中に導入することが望まれる任意の遺伝子を選ぶことができる。例えば、外来遺伝子は、治療の対象となる疾患に関連している酵素や、タンパク質、アンチセンス核酸もしくはリボザイムまたはフォルスプライマー（例えば、WO 90/

13641号参照)、細胞内抗体(例えば、WO 94/02610号参照)、増殖因子等をコードするものを使用することができる。

本発明で用いるレトロウイルスベクターは、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を有していてもよい。マーカー遺伝子としては、例えば、細胞に抗生物質に対する耐性を付与する薬剤耐性遺伝子や、酵素活性の検出によって遺伝子導入された細胞を見分けることができるレポーター遺伝子が利用できる。

使用できるベクターには、例えば、公知のMFGベクター(ATCC No. 68754)や α -SGC(ATCC No. 68755)等のレトロウイルスベクターがある。また、本願明細書の下記の実施例において使用したN2/ZipTKNEOベクター(TKNEO、Blood、第78巻、第310~317頁、1991年)およびPM5neoベクター(Exp. Hematol.、第23巻、第630~638頁、1995年)は、いずれもマーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子(ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子)を含有している。したがって、これらのベクターによって遺伝子導入された細胞は該遺伝子産物により不活化される抗生物質(ネオマイシン、G418等)に対する耐性を有する細胞として確認することができる。また、これらのベクターは公知のパッケージング細胞株、例えば、公知のPG13(ATCC CRL-10686)、PG13/LNc8(ATCC CRL-10685)、PM317(ATCC CRL-9078)や米国特許5,278,056号に記載の細胞株、GP+E-86(ATCC CRL 9642)やGP+envAm-12(ATCC CRL 9641)等の細胞株を使用することにより、該ベクターがパッケージングされたウイルス粒子として調製することができる。

本明細書において、機能性物質の有効量とは、レトロウイルスによる標

的細胞への遺伝子導入により、標的細胞の形質転換が生じるのに有効な量であり、用いる機能性物質、レトロウイルスおよび標的細胞の種類により、本明細書記載の方法により、選定することができる。また、遺伝子導入効率とは、形質転換効率を意味する。

レトロウイルスと結合し、その結果、本発明で有効に役立つ機能性物質の能力は、下記実施例に記載したような、定型的な方法を使用して確認することができる。

これらのアッセイは、レトロウイルス粒子がマトリックス上に固定された本発明に使用できる機能性物質と結合して、その結果、レトロウイルスがマトリックスからの洗い流しに抵抗する程度を測定する。簡単に言えば、例えば、ウイルス含有上清液を、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質の固定物を含有するウエル中でインキュベートする。ついで、このウエルを生理的食塩緩衝液で徹底的に洗浄し、その後、標的細胞をウエル内でインキュベートしてウエル内に残存しているウイルスの感染活性値を測定する。最初にウエルに添加されたウイルス上清液と比較して、感染活性または力価の減少を評価し、類似する対照実施（例えば、BSA固定化ウエルを使用して）と比較する。対照ウエルと比較して、本発明の機能性物質を固定化したウエル内の残存力価が顕著に高いことは、当該物質が本発明のレトロウイルス結合部位を有する機能性物質として用いることができることを意味する。

このスクリーニング方法を促進するために、ウイルスベクターは選択可能なマーカー遺伝子を含有することができる。

この方法により、本発明で使用するレトロウイルス結合部位を有する機能性物質のスクリーニングを行うことができる。

このようなレトロウイルス結合部位を有する機能性物質としては、フィ

プロネクチンのヘパリン－I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位を有する機能性物質が挙げられる。

本発明で使用される機能性物質の細胞結合部位、すなわち、標的細胞結合性のリガンドを含有する物質と、細胞との結合は慣用の方法を使用して同様にアッセイすることができる。例えば、このような方法には、Nature 352: 438～441 (1991年) に記載された方法が含まれる。

簡単に言えば、細胞結合部位を有する機能性物質を培養プレート上に固定化し、アッセイすべき細胞集団は培地に重層して30分から2時間置く。このインキュベーション期間後に、機能性物質に接着していない細胞を回収し、計数し、生存性についてアッセイする。機能性物質と接着した細胞もトリプシンまたは細胞解離緩衝液 (例えば、Gibco) を使用して回収し、計数し、そして生存性を試験する。場合によっては、例えば、造血コロニー形成細胞では、細胞をさらに12～14日間培養して細胞のコロニー形成特性を確認する。ついで、接着細胞の割合を計算し、ウシ血清アルブミン (BSA) を固定化した培養プレートのような標準ないし標準対照と比較する。標的細胞とアッセイした機能性物質の実質的な結合によって、機能性物質／細胞の組合せが本発明に適しており、この標的細胞結合部位を有する機能性物質を、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質と結合または共存させて、ウイルスベクターによる標的細胞の感染を測定することによって、本発明に使用する機能性物質を構築することができる。

本発明に使用できるレトロウイルス結合部位を有する機能性物質としては、上記のように、線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位が選択できるが、これらの物質と同等のレトロウイルス結合活性を有し、標的細胞結合部位を有するリガンドとの結合

または共存において、レトロウイルスによる標的細胞の遺伝子導入効率を向上させる物質は全て、線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位と機能的な同等物に包含される。

上記方法により、選定されたレトロウイルス結合部位を有する機能性物質と、標的細胞結合部位を有する機能性物質との結合または共存下において、本発明の遺伝子導入方法に使用する標的細胞、レトロウイルスを使用し、その遺伝子導入効率の向上性を測定することにより本発明に使用する機能性物質の有効量が決定できる。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の1つの態様は、レトロウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入効率を高める方法である。この方法は、レトロウイルスベクターによる細胞への遺伝子導入効率を高めるのに有効な、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質と、標的細胞結合部位を有する他の機能性物質との混合物の共存下にレトロウイルスベクターを生存可能な標的細胞に感染させることを特徴とする。

この方法は、レトロウイルスベクターによって遺伝子導入された遺伝子導入細胞を得る方法として使用でき、該細胞を生物個体に移植することによる生物個体への遺伝子導入を可能にする。

用いるレトロウイルス結合部位を有する機能性物質としては、特に限定ではなく、例えば、フィブロネクチンのヘパリン-ⅠⅠ結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジン等があり、またこれらの機能性物質と機能的に同等な物質、例えば、ヘパリン結合性部位を有する機能性物質も使用することができる。また、該機能性物質の混合物、該機能性物質を含有するポリペプチド、該機能性物質の重合体、該機能性物質の誘導体等を使用することができる。これらの機能性物質は、天然起源の物質から得

ることができ、また、人為的に作製する（例えば、遺伝子組換え技術や化学合成技術によって作製する）ことができ、さらに、天然起源の物質と人為的に作製された物質との組合せにより作製することもできる。

なお、用いる機能性物質は、本明細書中に示される高効率での遺伝子導入の達成が可能なレトロウイルス結合部位および／または標的細胞結合部位を有している範囲においては、天然起源のポリペプチドのアミノ酸配列に変異が生じたものであってもよい。本明細書においては天然起源のポリペプチドのアミノ酸配列中の1あるいは、例えば、数個までの複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されていても、所望のレトロウイルス結合部位および／または標的細胞結合部位を有する限り、そのポリペプチドを天然アミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的同等物と呼ぶ。これらの機能的同等物は、該機能的同等物をコードする遺伝子を作製、使用して当該機能的同等物を作製したうえ、その生物活性を確認することにより得ることができる。

この点に関して、関連バイオテクノロジー技術は、対象の機能的領域中のアミノ酸の欠失、置換、付加または他の修飾を定型的に実施することができる状態にまで進歩している。つぎに、得られたアミノ酸配列は、所望の細胞結合活性またはウイルス結合活性について定型的に上記のスクリーニングに付すことができる。

また、該機能性同等物をコードする遺伝子は、上記の機能性物質をコードする遺伝子にハイブリダイズする遺伝子を検索することにより、得ることができる。

すなわち、上記の機能性物質をコードする遺伝子またはその塩基配列の一部をハイブリダイゼーションのプローブまたはP C R等の遺伝子增幅法のプライマーに用いることにより、本酵素類似の活性を有するタンパクを

コードする遺伝子をスクリーニングすることができる。なお、該方法では目的の遺伝子の一部のみを含むDNA断片が得られることがあるが、その際には、得られたDNA断片の塩基配列を調べてそれが目的の遺伝子の一部であることを確かめた上、該DNA断片またはその一部をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うか、または該DNA断片の塩基配列に基づいて合成されたプライマーを用いてPCRを行うことにより、目的の遺伝子全体を取得することができる。

上記のハイブリダイゼーションは、例えば、以下の条件で行うことができる。

すなわち、DNAを固定したメンブレンを0.5% SDS、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、0.01% 変性サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0を示す) 中で、50°Cにて12~20時間、プローブとともにインキュベートする。インキュベーション終了後、0.5% SDS を含む2×SSC中、37°Cでの洗浄から始めて、SSC濃度は0.1×までの範囲で、また、温度は50°Cまでの範囲で変化させ、固定されたDNA由来のシグナルがバックグラウンドと区別できるようになるまでメンブレンを洗浄する。

また、こうして得られた新たな遺伝子について、そこにコードされているタンパクの有する活性を、上記と同様の方法によって調べることにより、得られた遺伝子が目的とするものであるかどうかを確認することができる。

上記WO 95/26200号に記載のように、フィブロネクチンのヘパリン-ⅠⅠ結合領域はレトロウイルス結合部位を有するポリペプチドである。繊維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンはフィブロネクチンの

ヘパリン-Ⅱ結合領域との間に構造的な類似（例えば、アミノ酸配列上の類似性）が見られる物質ではないが、本発明者らは、これらの物質がレトロウイルス結合部位を有していることを見いだした。

本発明に使用される標的細胞結合部位を有する機能性物質も、特に限定はないが、標的細胞に結合するリガンドを有する物質であり、該リガンドとしては細胞接着性のタンパク質、ホルモンやサイトカイン、細胞表面の抗原に対する抗体、多糖類や糖タンパク、糖脂質中の糖鎖、あるいは標的細胞の代謝物などが挙げられる。また、該機能性物質を含有するポリペプチド、該機能性物質の重合体、該機能性物質の誘導体、該機能性物質の機能的同等物等を使用することもできる。これらの機能性物質は天然起源の物質から得ることができ、また、人為的に作製する（例えば、遺伝子組換え技術や化学合成技術によって作製する）ことができ、さらに、天然起源の物質と人為的に作製された物質との組合せにより作製することもできる。

使用される細胞接着タンパク質としては、フィブロネクチンやそのフラグメントがある。例えば、米国特許第5,198,423号に記載の、P r o 1239-S e r 1515に対応するヒトフィブロネクチンの細胞結合ドメインは、本明細書に記載のポリペプチドC-274と同等の機能を有しており、BHKおよびB16-F10細胞等と結合することが示されている (J. Bi ochem.、第110巻、第285~291頁、1991年)。これらのポリペプチド中に存在するRGDSの4アミノ酸からなる配列はVLA-5レセプターのリガンドである。VLA-5レセプターの発現は広範な細胞において見られるが、分化した細胞よりも未分化なものによく発現している。また、フィブロネクチン中のCS-1領域はVLA-4レセプターのリガンドとして知られており、該レセプターを発現している細胞 (T細胞、B細胞、単球、NK細胞、好酸球、好塩基球、胸腺細胞、骨髓単球系細胞、赤芽球系前駆

細胞、リンパ球系前駆細胞、メラノーマ、筋細胞等）に結合する。特開平3-284700号に記載のポリペプチドで、配列表の配列番号29で表されるポリペプチド（以下C277-CS1と称す）は上記のVLA-5、およびVLA-4レセプターのリガンドの両方を含有するポリペプチドであり、本発明の方法において、これらのレセプターを有する細胞への遺伝子導入に使用することができる。さらに、ヘパリン-1I領域は纖維芽細胞、内皮細胞および腫瘍細胞と結合することが示されている。ヘパリン-1I領域の細胞結合部位ポリペプチド配列はレトロウイルス結合部位を有する機能性物質のポリペプチドの存在下で、レトロウイルスベクターの感染を予め定められた細胞に向けるうえで有用である。

細胞特異的な作用を有するホルモンやサイトカイン類は本発明の方法に使用される細胞結合部位を有する機能性物質として適している。例えば、造血系のサイトカインであるエリスロポエチンを使用することにより、赤血球系の細胞への遺伝子導入を行うことができる。エリスロポエチンは公知の方法にて作製し、使用することができる。また、該エリスロポエチンの機能的同等物およびエリスロポエチンまたは該エリスロポエチンの機能的同等物を含有するポリペプチドも使用することができる。

下記実施例に示されるように、レトロウイルス結合活性を有する機能性物質（例えば、H-271や纖維芽細胞増殖因子）をフィブロネクチン由来の細胞結合活性を有するポリペプチドC-274等との混合物で使用した場合には高い遺伝子導入効率を得ることができる。これらの実験に用いたNIH/3T3細胞はC-274と結合可能なVLA-5レセプターを発現しており、この両者の相互作用が遺伝子導入効率の向上に寄与している。

さらに、同様な現象はエリスロポエチンレセプターを発現するTF-I

細胞 (Blood、第73巻、第375～380頁、1989年)への遺伝子導入にエリスロポエチン誘導体を共存させた場合にも観察される。しかも、この効果はエリスロポエチンレセプターを有していない細胞では認められない。

これらの結果より、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質と細胞結合部位を有する他の機能性物質との共存による細胞特異的な遺伝子導入効率の上昇が起こることが明らかにされた。

本発明のこの態様においては、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質を、他の標的細胞との結合部位を有する機能性物質との混合物として使用する。これによって、当該機能性物質に親和性を有する標的細胞へのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入の効率を顕著に高めることができる。こうして、遺伝子導入効率が向上することにより、ウイルス産生細胞との共培養の回避が可能となることは、本発明の1つの利点である。

目的とする細胞に選択的に遺伝子を導入する手段は利用価値が高く、これまでにも様々な方法が研究されており、例えば、目的細胞の表面に存在するレセプターに結合する物質とDNA結合性物質とを結合させた非ウイルスベクター (molecular conjugation vector) がある。該ベクターを利用した遺伝子導入の例としては、アシアロ糖タンパクを用いた肝ガン細胞への導入 (J. Biol. Chem.、第262巻、第4429～4432頁、1987年)、トランسفェリンを用いたリンパ芽球細胞への導入 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第89巻、第6099～6103頁、1992年)、抗EGFレセプター抗体を用いたガン細胞への導入 (FEBS Letters、第338巻、第167～169頁、1994年) 等が知られている。このような非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、導入された遺伝子が細胞の染色体DNA上に組み込まれないため、導入された遺伝子の長期にわたる発現が望まれる場合には好ましい方法では

ない。染色体上への遺伝子組み込みが可能なベクターとして繋用されるレトロウイルスベクターを用い、これを特定の細胞に感染させようとする試みも行われており、例えば、レトロウイルス粒子を直接化学修飾してラクトースを結合させることによる肝細胞への遺伝子導入 (J. Biol. Chem.、第266巻、第14143～14146頁、1991年)、エリスロポエチンとの融合タンパクとしたエンベロープタンパクを有する組換えウイルス粒子を利用したエリスロポエチンレセプター発現細胞への遺伝子導入 (Science、第266巻、第1373～1376頁、1994年) 等が開発されている。しかし、この目的のためには標的細胞に応じて特別なウイルス粒子の調製を要する。さらに、ウイルス粒子の化学修飾は煩雑な操作を必要とする上に、ウイルスの不活化を招くおそれがあり、また、遺伝子工学的に改変したウイルスエンベロープについては、必ずしも必要な機能（標的細胞への結合、およびウイルス粒子の構築）を有するものが得られるとは限らない。

上記WO 95/26200号には、細胞結合活性を有する適当なリガンドを共有結合させたフィブロネクチンのフラグメント共存下においては、特別な修飾をしていないレトロウイルスベクターを目的とする細胞に導入することが可能であることが示唆されている。しかし、該方法ではウイルス結合活性と細胞への結合活性の両方を有する機能性分子を用いるため、標的細胞ごとに個別の機能性物質を作製しなければならない。また、作製された機能性物質に両活性が保持されているかどうかは明らかでない。

本発明によるレトロウイルス結合部位を有する機能性物質と、標的細胞との結合部位を有する他の機能性物質との組み合わせは、広範囲の細胞種に対してレトロウイルスベクターを用いた遺伝子の送達系が提供できる。この目的のためには、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質と、標的細胞との結合部位を有する機能性物質とが共有結合によって結合されて

いる必要はない。したがって、標的となる細胞ごとに、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質と、標的細胞との結合部位を有する機能性物質とが共有結合によって結合された、特定の機能性物質を作製する必要がなく、目的の細胞への遺伝子導入を簡便、かつ効率よく行うことができる。

本発明の方法を用いた標的細胞への遺伝子導入の例としては、造血系の細胞への遺伝子導入が挙げられる。上記のフィブロネクチンのCS-1細胞接着領域は造血幹細胞への遺伝子導入に有用なことが知られている。また、造血系の細胞の分化には上記のエリスロポエチンの他にも多数の細胞特異的なサイトカインが関与していることが知られており、これらを利用することによって目的とする細胞（細胞系）に特異的に遺伝子を導入できる。例えば、G-CSFを用いた場合には巨芽球、および顆粒球前駆細胞を標的とすることが可能である。

細胞結合活性部位を有する機能性物質として、悪性細胞と、特異的または優先的に結合する物質を用いることにより、これらの細胞を標的として遺伝子導入を行うこともできる。

例えば、ある種の肺癌細胞においてはHER-2、HER-4というレセプターが過剰発現していることが知られている（Proc. Nat. Acad. Sci. USA、第92巻、第9747～9751頁、1995年）。したがって、該レセプターに対するリガンドのヘリグリン（heregulin）をレトロウイルス結合部位を含有する機能性物質と組み合わせることにより、肺癌細胞の増殖を制御することが可能となる。

また、例えば、甲状腺（癌）細胞に対してはヨウ素を有する機能性物質を、また、肝臓（癌）細胞は高密度リポタンパク質（High-density lipoprotein、HDL）やアシクロ糖タンパク質またはこれら的一部を含有する機能性物質を使用することによって遺伝子導入の標的とすることができる。

さらに、標的細胞の表面に存在する抗原に対する抗体、好適にはモノクローナル抗体を、細胞結合活性を有する機能性物質として使用することにより、抗体が入手できる任意の細胞を標的とすることが可能となる。こうして、本発明により開示されるレトロウイルスベクターと標的細胞との配置方法を使用することにより、広範囲の種類の細胞を標的とすることができる。

特に、好ましい態様は、レトロウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入効率を高める方法において、新規な機能性物質を用いて遺伝子導入を行う。

これまでレトロウイルスによる細胞への遺伝子導入に有効とされたレトロウイルス結合部位を有する機能性物質はフィブロネクチンのヘパリン-I I 領域のみである。

上記のように該領域は、それ自体特定の細胞に対して結合部位を有しており、標的細胞によってはこの活性が望ましくない場合がある。このような場合には、この結合部位を他の標的細胞結合部位に置き換えることにより、目的を達成することが可能となる。このように、性質の異なる複数の機能性物質が使用可能なことは、本発明による遺伝子治療の適用範囲を広げることにつながり、目的の標的細胞へのターゲッティングも容易に行うことができる。

本発明により提供される、新規なレトロウイルス結合部位を有する機能性物質としては、線維芽細胞増殖因子、該因子を含有するポリペプチド、コラーゲンのフラグメント、該フラグメントの混合物、該フラグメントを含有するポリペプチド、該機能性物質の重合体等が挙げられる。また、ポリリジンも本発明の目的に使用することができる。これらの機能性物質は、天然起源の物質から得ることができ、また、人為的に作製する（例えば、

遺伝子組換え技術または化学合成技術によって作製する) ことができ、さらに、天然起源の物質と化学的に合成された物質との組合せにより作製することもできる。該機能性物質は、本発明の第1の発明の遺伝子導入方法にも使用でき、また、該機能性物質と細胞結合活性を有する機能性物質とのキメラ分子も細胞への遺伝子導入に有用である。

上記の新規な機能性物質はいずれもレトロウイルス結合活性を有している。しかしながら、これらの物質は上記WO 95/26200号に記載の、ヒトフィブロネクチンのヘパリン-ⅠⅠ結合領域またはそれに類似したアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有するものではない。

本発明に使用される線維芽細胞増殖因子としては、実質的に純化された天然物を使用しても良く、また、遺伝子工学的に作製されたものを使用しても良い。本発明には、配列表の配列番号3で表される線維芽細胞増殖因子を使用することができ、さらに、これらのポリペプチドの機能を損なうことなく改変された誘導体も使用することができる。線維芽細胞増殖因子誘導体の例としては、配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(以下、C-F G F · Aと称する)がある。これは配列番号3で表される線維芽細胞増殖因子のN末端にフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドが結合したポリペプチドであり、米国特許第5,302,701号に記載の方法により遺伝子工学的に製造することができる。該ポリペプチドは該米国特許にFERM P-12637として記載され、現在はブタペスト条約の下、FERM BP-5278の受託番号で茨城県つくば市東1丁目1番3号の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託されている大腸菌(原寄託日:平成3年12月9日)を使用することによって得ることができる。

また、配列番号5で表される、フィブロネクチン由来のCS-1細胞接

着領域を有する上記の C-FGF・A の誘導体ポリペプチド（以下、C-FGF-CS1 と称する）は、上記の茨城県つくば市東1丁目1番3号の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、ブタペスト条約の下、FERM BP-5654 の受託番号で寄託されている大腸菌（原寄託日：平成8年9月6日）を使用し、本願明細書に記載の方法で得ることができる。この C-FGF-CS1 は CS-1 結合性を有する標的細胞、特に造血幹細胞への遺伝子導入において特に有用である。

コラーゲンのフラグメントとしては、天然型のコラーゲンを酵素学的、化学的に分解し、実質的に純化したフラグメントを使用しても良く、また、遺伝子工学的に作製されたものを使用しても良い。さらに、これらのフラグメントの機能を損なうことなく改変されたものも使用することができる。コラーゲンの中で、ヒトV型コラーゲンは強いインスリン結合活性を有し（特開平2-209899号）、インスリン結合部位を含有するポリペプチドとしては配列表の配列番号28で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドがあり（特開平5-97698号）、その例としては、配列表の配列番号6で表されるポリペプチド（以下、Co1V と称する）が挙げられる。Co1V は本願明細書実施例に開示の方法で作製することができる。Co1V を含有するポリペプチドであって、配列番号7で表されるポリペプチド（以下、C277-Co1V と称する）は、Co1V のN末端にフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドが結合したポリペプチドであり、上記特開平5-97698号に記載されているように遺伝子工学的に製造することができる。C277-Co1V は該公開公報に FERM P-12560 として記載され、現在はブタペスト条約の下、FERM BP-5277 の受託番号で茨城県つくば市東1丁目1番3号の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている大腸菌（原寄託日：

平成3年10月7日)を使用することによって得ることができる。

配列番号8で表される、フィブロネクチン由来のCS-1細胞接着領域を有する上記のC277-Co1Vの誘導体ポリペプチド(以下、C-Co1V-CS1と称する)は以下に示す方法によって作製することができる。ブタペスト条約の下、FERM BP-2800の受託番号で茨城県つくば市東1丁目1番3号の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている大腸菌(原寄託日:平成1年5月12日)より調製されるプラスミドpCH102を鋳型とし、プライマーCS1-S(配列表の配列番号9にその塩基配列を示す)およびM4を用いたPCR反応により増幅されるDNA断片を制限酵素NheI、SalIで消化した後に単離する。

一方、上記C277-Co1Vをコードする遺伝子を含み、上記大腸菌FERM BP-5277より調製されるプラスミドpTF7520Co1Vを鋳型とし、プライマーCF、およびCNRを用いたPCR反応により増幅されるDNA断片を制限酵素AccIII、NheIで消化した後に単離する。配列表の配列番号10および12にCFおよびCNRのそれぞれの塩基配列を示す。上記の2つのDNA断片を、プラスミドpTF7520Co1Vを制限酵素AccIII、SalIで消化して得られる約4.4kbのDNA断片と混合し、ライゲーションを行って得られる組換えプラスミドはC277-Co1VのC末端側にCS-1細胞接着領域を有し、Co1VのC末端より2番目のグルタミン酸がアラニンに、C末端のスレオニンがセリンにそれぞれ置換されたポリペプチド、C-Co1V-CS1をコードしている。このプラスミドで形質転換された大腸菌を培養した後、培養物より目的のポリペプチドを取得することができる。このC-Co1V-CS1はCS-1結合性を有する標的細胞、特に幹細胞への遺伝

子導入において特に有用である。

ポリリジンとしては、上記のごとく、市販のポリリジンより適當な重合度のポリリジンを選択し、使用することができる。

本発明で使用する機能性物質としては、上記の機能性物質の誘導体も使用することができる。上記の C - F G F - C S 1 またはその機能的同等物、C - C o 1 V - C S 1 またはその機能的同等物はその例である。また、これらの機能性物質を複数の分子結合させた重合体や、機能性物質を公知方法により修飾したもの（糖鎖の付加等）も本発明に使用することができる。これら誘導体および該誘導体の機能的同等物は、該誘導体をコードする遺伝子および該誘導体の機能的同等物をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することもできる。さらに、これらの機能性物質のアミノ酸配列中にシステインを付加、挿入、置換することにより、機能性物質の誘導体の作製に有用なシステイン化機能性物質を作製することができる。また、システイン化機能性物質であって、レトロウイルス結合部位を有する分子と、システイン化機能性物質であって標的細胞結合部位を有する他の分子とを結合させることも容易である。さらに、システイン化機能性物質のシステイン残基の反応性を利用して他の機能性物質との結合体を作製することができる。

別の好ましい態様では、レトロウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入効率を高めるフィブロネクチンのレトロウイルス結合部位ポリペプチドの重合体を用いて遺伝子導入を行う。

該機能性物質は上記 WO 95/26200 号に記載の、ヒトフィブロネクチンのヘパリン - I I 結合領域を一分子内に複数個有するポリペプチド、および該ポリペプチドの誘導体である。なお、本発明に使用する機能性物質としては、該機能性物質と同等の活性を有する範囲内で、天然起源のポ

リペプチドとはそのアミノ酸配列が一部異なっている機能的同等物を含むことができる。

用いる機能性物質の重合体としては上記のフィブロネクチン由来のポリペプチドを酵素学的または化学的に重合させたものや、遺伝子工学的に作製されたものがある。フィブロネクチンのヘパリン－ⅠⅠ結合領域を一分子内に2個有するポリペプチドとしては配列表の配列番号13にアミノ酸配列を示すポリペプチド（以下、H2-547と称す）が挙げられる。H2-547はブタペスト条約の下、FERM BP-5656の受託番号で茨城県つくば市東1丁目1番3号の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている大腸菌（原寄託日：平成8年9月6日）を使用し、本明細書に記載の方法によって取得することができる。また、配列表の配列番号14にアミノ酸配列を示すポリペプチドは、H2-547のN末端にフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドが結合した誘導体ポリペプチド（以下、CH2-826と称す）である。該ポリペプチドは本明細書に記載の方法にしたがって取得することができる。さらに、配列表の配列番号30にアミノ酸配列を示すポリペプチドは、H2-547のC末端にフィブロネクチンのCS-1細胞接着領域を結合した誘導体ポリペプチド（以下、H2S-573と称す）である。該ポリペプチドはブタペスト条約の下、FERM BP-5655の受託番号で茨城県つくば市東1丁目1番3号の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている大腸菌（原寄託日：平成8年9月6日）を使用し、本明細書に記載の方法によって取得することができる。CS-1細胞接着領域を有するH2S-573は造血幹細胞への遺伝子導入に有用である。

また、別の好ましい態様においては、レトロウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入において、レトロウイルスベクターによる細胞へ

の遺伝子導入効率を向上させるのに有効な、ビーズ上に固定された機能性物質との共存下に複製能欠損組換えレトロウイルスベクターを生存可能な標的細胞に感染させる。

従来の、上記のWO 95/26200号およびNature Medicineに記載の機能性物質を用いてレトロウイルスベクターによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法は、これまでウイルスを細胞に感染させる際に使用する容器（細胞培養用のプレート）の表面に該機能性物質を固定化することにより実施してきた。この方法では、プレートを機能性物質を含有する溶液で処理した後、さらに余分の機能性物質を洗い流すなど、煩雑な操作を要する。

このように、機能性物質が固定化されたプレートを使用する遺伝子導入方法は簡便な方法とは言い難い。これに対して、機能性物質をビーズ上に固定して使用する方法はつきのような利点を有している。

機能性物質をビーズに固定する操作はプレートの場合に比べて小さなスペースで行うことができ、また、ビーズを密閉可能な容器中で取り扱える。機能性物質が固定化されたプレートはその表面が空気にさらされるため、安定性の低い機能性物質の場合には保存中の乾燥による機能性物質の変質等に気を配る必要があるが、ビーズは溶液中に懸濁して保存することができるため、乾燥の危険はない。さらにビーズの使用は機能性物質の存在する表面積を大きくすることから、プレート使用に比べて高い遺伝子導入効率を得ることも可能となる。

機能性物質の固定化は常法により行えばよく、例えば、標的細胞培養容器に固定化しても良く、例えば、細胞培養用のビーズに固定化しても良い。ビーズの素材、材質等は使用する目的によって選択することができる。ビーズとしては、例えば、中心の丸い、または球状の核を持ち、核の表面は

親水性のポリマーで被覆されているものでもよい。この核やポリマーの素材としては、例えば、特表平8-501092号に記載のものが例示される。例えば、生分解性ビーズを使用し、これらの機能性物質が固定化されたビーズを生体内に投与することもできる。また、レトロウイルス結合部位を有する分子が固定化されたビーズと、標的細胞結合部位を有する他の分子が固定化されたビーズとを混合して使用するのも効率の良い方法である。

これらの機能性物質を固定化せずに使用する場合は、例えば、標的細胞培養容器を、予め、該機能性物質の吸着を防止する物質、例えば、牛血清アルブミン（B S A）で前処理し、これらの機能性物質の非特異的吸着を防止して使用すればよい。

本発明によれば、このような非固定の系においても、本発明に使用する機能性物質により、遺伝子導入が効率良く達成される。

また、後に説明する、本発明の方法の実施用に設計されたキットは、細胞への遺伝子導入を極めて簡便に実施することを可能にする。

上記のごとく、本発明の方法によって遺伝子を導入された細胞は生体に移植することができ、これによって生体内で外来遺伝子を発現させる遺伝子治療を行うことができる。

例えば、造血幹細胞を標的細胞とした遺伝子治療は以下のような操作によって実施することができる。まず、ドナーより造血幹細胞を含有する材料、例えば、骨髄組織、末梢血液、臍帯血液等を採取する。これらの材料はそのまま遺伝子導入操作に用いることも可能であるが、通常は、密度勾配遠心分離等の方法により造血幹細胞が含まれる単核細胞画分を調製するか、さらに、C D 3 4 および／またはC - k i t といった細胞表面のマーカー分子を利用した造血幹細胞の精製を行う。これらの造血幹細胞を含有

する材料について、必要に応じて適当な細胞増殖因子等を用いた予備刺激を行った後、本発明の方法、とりわけ、造血幹細胞への結合活性を有する機能性物質の存在下に、目的とする遺伝子を挿入された組換えレトロウイルスベクターを感染させる。こうして得られた遺伝子導入された細胞は、例えば、静脈内投与によってレシピエントに移植することができる。レシピエントは、好ましくはドナー自身であるが、同種異系移植を行うことも可能であり、例えば、臍帯血液を材料とした場合には同種異系移植が行われる。

造血幹細胞を標的とした遺伝子治療としては、患者において欠損しているか、異常が見られる遺伝子を補完するものがあり、例えば、ADA欠損症やゴーシュ病の遺伝子治療がこれにあたる。この他、例えば、ガンや白血病の治療に使用される化学療法剤による造血細胞の障害を緩和するために、造血幹細胞への薬剤耐性遺伝子の導入が行われることがある。

造血幹細胞はVLA-4レセプターを発現していることが知られており、本発明により開示されたCS-1細胞接着領域を有する機能性物質を利用して効率よく遺伝子導入を行うことが可能である。また、造血幹細胞表面には上記のようにCD34、C-kitといった分子も発現されており、これらの分子に対する抗体やC-kitのリガンドである幹細胞因子(stem cell factor)をレトロウイルス結合部位を有する機能性物質と組み合わせることによっても、遺伝子導入効率を向上させることができる。

また、癌の遺伝子治療法としては、癌細胞にサイトカイン類の遺伝子を導入した後にその増殖能力を奪って患者の体内に戻し、腫瘍免疫を増強させる腫瘍ワクチン療法が研究されている(Human Gene Therapy、第5巻、第153～164頁、1994年)。癌細胞に高い親和性を有する機能性物質を用いて本発明の方法を適用することにより、このような遺伝子治療も、より効

果の高いものとなる。

また、AIDSを遺伝子治療法によって治療しようという試みも行われている。この場合には、AIDSの原因であるHIV（ヒト免疫不全ウイルス）の感染するT細胞に、HIVの複製や遺伝子発現を妨げるような核酸分子（アンチセンス核酸やリボザイム等）をコードする遺伝子を導入することが考えられている（例えば、J. Virol.、第69巻、第4045～4052頁、1995年）。T細胞への遺伝子導入は、T細胞表面に存在する分子に結合する機能性物質、例えば抗CD4抗体等を利用し、本発明の方法により達成することができる。

このように、遺伝子導入される標的細胞としては、上記した本発明の態様に従って、該標的細胞結合部位を有する機能性物質が入手、あるいは作製可能な範囲の任意の細胞を使用することができる。

また、本発明の方法は標的細胞をレトロウイルス産生細胞の存在下で共培養する必要のないこと、およびヒトにおいては臨床での使用に問題のあるヘキサジメトリン・ブロミドを使用しないこと等の点から、臨床における遺伝子治療のプロトコールとしても適したものといえる。

さらに、遺伝子治療以外の分野への本発明の適用として、例えば、標的細胞として胚形成幹細胞、プライモディアル・ジャーム・セル、卵母細胞、卵原細胞、卵子、精母細胞、精子等を使用した、トランスジェニック脊椎動物の簡便な作成を挙げることができる。

すなわち、本発明は、その1つの態様として、本発明の方法で得られる形質転換細胞を脊椎動物に移植する細胞移植方法も提供する。形質転換細胞が移植される脊椎動物としては、哺乳類（例、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、イヌ、サル、チンパンジー、ヒト等）、鳥類（例、ニワトリ、七面鳥、ウズラ、アヒル、カモ等）、爬虫類（例、ヘビ、ワ

ニ、カメ等)、両生類(例、カエル、サンショウウオ、イモリ等)、魚類(例、アジ、サバ、スズキ、タイ、ハタ、ブリ、マグロ、サケ、マス、コイ、アユ、ウナギ、ヒラメ、サメ、エイ、チョウザメ等)が挙げられる。

かくして、本発明のこの態様によれば、実質的に純粹なフィブロネクチン、実質的に純粹なフィブロネクチンフラグメントまたはそれらの混合物と同様に、本発明に使用する機能性物質のレトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位により、レトロウイルスによる遺伝子導入が効率良く行われる。それにより、従来の方法の限界を有していない、遺伝子材料の脊椎動物細胞内への効率的な導入可能な技術が提供できる。

本発明のさらなる別の態様においては、レトロウイルス結合部位と、標的細胞結合部位とを同一分子中に有する、実質的に純粹なフィブロネクチン、実質的に純粹なフィブロネクチンフラグメントまたはそれらの混合物と同等の機能を有する物質の有効量を機能性物質として使用する。

かかる機能性物質としては、フィブロネクチン、フィブロネクチンフラグメントまたはそれらの混合物と同等の効率で遺伝子導入を行う物質であり、典型的には、上記した本発明による新規なレトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位とを同一分子中に有する機能性物質が挙げられる。これらの機能性物質を使用する場合は、少なくとも1以上の機能性物質にレトロウイルスと標的細胞とが結合すると考えられる。

上記したレトロウイルス結合部位と、標的細胞結合部位とを同一分子中に有する機能性物質は、例えば、配列表の配列番号21および22で表されるポリペプチド(以下、各々、CHV-181およびCHV-179と称する)が包含される。

これらのペプチドはH-271中に含まれるIII型類似配列(III-12、III-13、III-14)を含むものであり、CHV-181はIII-12、

III-13配列が、また、CHV-179はIII-13、III-14配列がそれぞれフィブロネクチンの細胞接着ポリペプチド(Pro1239-Ser1515)のC末端にメチオニンを介して付加されたものである。

ポリペプチドCHV-181を発現するためのプラスミドは、例えば、以下に示す方法によって構築することができる。

まず、フィブロネクチンのヘパリン結合ポリペプチド(H-271)をコードするDNA断片を含有するプラスミドpHD101をエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)HB101/pHD101(FERM-BP-2264)より調製する。このプラスミド上のIII-13配列のC末端をコードする領域に部位特異的変異導入方法によってHindIIIサイトを導入した後、これをNcoI、HindIIIで消化し、III-12、III-13配列をコードするDNA断片を得る。一方、プラスミドベクターpINIII-ompA1をHindIII、SalIで消化し、リポプロテインターミネーター領域をコードするDNA断片を得る。

つぎに、フィブロネクチンの細胞接着ポリペプチド(C-279)をコードするDNA断片を含有するプラスミドpTF7021をエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)JM109/pTF7021(FERM-BP-1941)より調製し、このプラスミド上のC-279の停止コドンの直前に部位特異的変異導入方法によってNcoIサイトを導入したプラスミドpTF7520を作製する。このプラスミドをNcoI、SalIで消化した後、上記のIII-12、III-13配列をコードするDNA断片、およびリポプロテインターミネーター領域をコードするDNA断片と混合してライゲーションを行うことにより、ポリペプチドCHV-181を発現するためのプラスミドpCHV181を得ることができる。配列表の配列番号27にプラスミドpCHV181上のポリペプチドCHV-1

81をコードする領域の塩基配列を示す。

また、ポリペプチドCHV-179を発現するためのプラスミドは、例えば、以下に示す方法によって構築することができる。

まず、上記のプラスミドpHD101上のIII-13配列のN末端をコードする領域に部位特異的変異導入方法によってNcoIサイトを導入した後、これをNcoI、HindIIIで消化し、III-13、III-14配列をコードするDNA断片を得る。これと、上記のリポプロテインターミネーター領域をコードするDNA断片と、NcoIおよびSalIで消化したプラスミドpTF7520とを混合してライゲーションを行うことにより、ポリペプチドCHV-179を発現するためのプラスミドpCHV179を得ることができる。

CHV-181およびCHV-179はそれぞれ上記のプラスミドで形質転換された大腸菌を培養した後、得られた培養物より精製を行って取得することができる。

これらの機能性物質も、非固定でも、上記と同様に、例えば、ビーズに固定しても使用できる。

さらに別の態様では、本発明は、(1)上記のレトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質の混合物または(2)上記の本発明の新規なレトロウイルス結合部位および標的細胞結合部位の有効量を同一分子中に有する機能性物質を含有するレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入に使用する標的細胞の培養培地を提供するもので、機能性物質は非固定でも、固定化されてもよい。

本発明の培養培地の他の成分は、標的細胞の培養に使用できるものであれば特に制限はなく、市販の細胞培養用培地を使用してもよい。また、本

発明の培地は、血清や標的細胞の生育に必要な細胞増殖因子、微生物などによる汚染を防ぐための抗生物質等を含むことができる。例えば、N I H／3 T 3 細胞の場合には、10%ウシ胎児血清（ギブコ社製）と、50単位／m l のペニシリン、50 μg／m l のストレプトマイシン（共にギブコ社製）とを含有するダルベッコ改変イーグル培地（D M E M、J R Hバイオサイエンス社製）を培養培地に用いることができる。

さらに別の態様では、本発明は、（1）上記したレトロウイルス結合部位を有する分子と、標的細胞結合部位を有する他の分子との混合物、（2）上記した本発明による新規なレトロウイルス結合部位と、標的細胞結合部位とを同一分子中に有する機能性物質、または（3）上記したレトロウイルス結合部位を有する機能性物質と接触したレトロウイルスを含有する培地をインキュベートすることを特徴とするレトロウイルスの配置方法を提供する。

該機能性物質は、非固定でも、上記のごとく、固定化されていてもよい。インキュベーションは、常法に従って行うことができ、例えば、37°C、CO₂濃度5%、湿度99.5%の条件で行うことができる。この条件は、使用する標的細胞に応じて適宜調整し、また、培養時間も細胞や目的に応じて変更することができる。

本発明の方法を使用すれば、例えば、標的細胞にウイルスを送達する広範囲の構築物中にウイルス粒子を配置させることができる。

本発明の別の態様では、標的細胞内へのレトロウイルス介在遺伝子導入の実施に使用するためのキットを提供する。

該キットは、

（a）有効量の、（1）上記したレトロウイルス結合部位を有する分子と、標的細胞結合部位を有する他の分子との混合物または（2）上記した

本発明による新規なレトロウイルス結合部位と、標的細胞結合部位とを同一分子中に有する機能性物質、

(b) 標的細胞と接触したレトロウイルスをインキュベートするための人工基質、および

(c) 上記標的細胞を予備刺激するための標的細胞増殖因子、を含んでなるキットを提供するもので、(a)の機能性物質は、非固定でも、固定化されていてもよく、このキットは、さらに、遺伝子導入に使用する組換えレトロウイルスベクターや、必要な緩衝剤等を含有していてよい。

人工基質としては、細胞培養用のプレート、ペトリ皿、フラスコ等を用いることができ、例えば、ポリスチレン製のものを使用できる。

標的細胞がG₀期の細胞である場合には、レトロウイルスが感染しないため、予備刺激によって細胞周期に誘導することが好ましく、この目的で、レトロウイルスの感染に先立って、標的細胞を適當な標的細胞増殖因子の存在下で培養する。例えば、骨髓細胞や造血幹細胞に遺伝子導入を行う場合の予備刺激には、インターロイキン-6 および幹細胞因子のような標的細胞増殖因子が使用される。

キットの各構成成分は、各々、自体公知の方法により、水溶液の他、凍結乾燥物、顆粒、錠剤等の剤形とすることができます、

本発明のキットを使用することにより、例えば、形質転換された生存可能な標的細胞培養物を得ることができ、標的細胞内へのレトロウイルス介在の遺伝子導入を簡便に実施することができる。

本発明はまた、実質的に純粹なフィブロネクチン、実質的に純粹なフィブロネクチンフラグメントおよびそれらの混合物より選択される機能性物質またはその重合体の有効量の非固定化物またはビーズ固定化物を使用す

る、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入も包含する。

本発明は、上記の CH 2-826 およびその機能的同等物を包含する。

また、本発明は、CH 2-826 をコードする遺伝子を提供し、配列表の配列番号 20 で表される遺伝子がその 1 例である。本発明はこれらの遺伝子の機能的同等物も包含する。

さらに、本発明は、上記の CHV-181 を提供し、本発明はその機能的同等物を包含する。また、CHV-181 をコードする遺伝子を提供し、配列表の配列番号 27 で表される遺伝子がその 1 例である。本発明はこの遺伝子の機能的同等物を包含する。

本発明はまた、レトロウイルス結合部位の重合体および／または標的細胞結合部位の重合体を含有する重合体を提供することができる。重合体の具体例としては線維芽細胞増殖因子の重合体、V型コラーゲン由来のインスリン結合部位を有するポリペプチドの重合体が例示される。これらの重合体をコードする遺伝子も提供する。

以下に考察するように、本発明は特定の理論によって限定されるものではないが、レトロウイルスと細胞とをそれぞれの機能領域部位に結合させることによって、レトロウイルスによる細胞への遺伝子導入、すなわち形質転換が促進される。

レトロウイルスと結合し、その結果、本発明で有効に役立つ機能性物質としては、実質的に純粋なフィブロネクチン、実質的に純粋なフィブロネクチンフラグメントまたはそれらの混合物があるが、本発明者らは、上記したような、これらと実質的に同等な機能を有する本発明の機能性物質が標的細胞のレトロウイルスによる遺伝子導入効率、すなわち形質転換効率を向上させることを見出したのである。

本明細書中に記載のフィブロネクチンのフラグメントは天然または合成

起源のものであることができ、例えば、ルオスラチ (Ruoslahti) ら (1981年)、J. Biol. Chem. 256: 7277; パテル (Patel) およびロディッシュ (Lodish) (1986年)、J. Cell. Biol. 102: 449; およびベルナルディ (Bernardi) 等 (1987年)、J. Cell. Biol. 105: 489 によって既に記載されたようにして、天然起源の物質から実質的に純粋な形態で製造することができる。この点に関して、本明細書で実質的に純粋なフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントと称しているのは、これらが天然においてフィブロネクチンと一緒に存在する他のタンパク質を本質的に含有していないことを意味する。

本明細書中に記載の実質的に純粋なフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントは、例えば、米国特許第5,198,423号に一般的に記載されているようにして、遺伝子組換え体より製造することもできる。特に、下記実施例でH-271、H-296、CH-271 (配列番号23) およびCH-296 (配列番号24) として同定された組換え体フラグメントならびにこれらを取得する方法はこの特許に詳細に記載されている。下記実施例で使用したC-274フラグメントは米国特許第5,102,988号に記載されているようにして得た。これらフラグメントまたはこれらフラグメントから定型的に誘導できるフラグメントは、米国特許第5,198,423号にも記載されているように、ブタペスト条約の下、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-10721 (H-296) (原寄託日: 平成1年5月12日) 、 FERM BP-2799 (メチオニンを介してH-271と結合したC-277、すなわち、CH-271) (原寄託日: 平成1年5月12日) 、 FERM BP-2800 (メチオニンを介してH-296と結合したC-277、すなわち、CH-296) (原寄託日: 平成1年5月12日)

およびFERM BP-2264 (H-271) (原寄託日: 平成1年1月30日) の受託番号のもとで寄託された大腸菌を培養することによって入手することができる。

さらに、本明細書で使用できるフィブロネクチンフラグメントまたはこのようなフラグメントの出発物質に関する有用な情報は、キミヅカ (Kimi zuka) ら、J. Biochem. 110、284～291 (1991年) (これは上記した組換え体フラグメントに関してさらに報告している) ; EMBO J.、4、1755～1759 (1985年) (これはヒトフィブロネクチン遺伝子の構造を報告している) ; およびBiochemistry、25、4936～4941 (1986年) (これはヒトフィブロネクチンのヘパリン-ⅠⅠ結合領域について報告している) 中に見ることができる。例えば、下記実施例に報告されているような種々の組換え体フラグメント中に含まれるようなCS-1細胞接着領域とヘパリン-ⅠⅠ結合領域との両方を有するフィブロネクチンフラグメントは、これまでの研究で造血細胞内への遺伝子導入効率を顕著に高めることが分かっている。

かくして、本明細書中に記載のフィブロネクチン関連ポリペプチドは、フィブロネクチンのCS-1細胞接着領域の細胞結合活性を提供するアミノ酸配列ならびにウイルスと結合するフィブロネクチンのヘパリン-ⅠⅠ結合領域のアミノ酸配列を提供する。

なお、上記WO 95/26200号に記載の、レトロウイルスベクターによる形質転換を高めるために使用されるウイルス結合ポリペプチドは(i)ヒトフィブロネクチンのヘパリン-ⅠⅠ結合領域のAla1690-Thr1960に相当する、下記の式(配列番号1)で表される第1のアミノ酸配列:

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser

Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val
 Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala
 Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr
 Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln
 Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
 Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu
 Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro
 Ile Gln Arg Thr Ile Cys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu
 Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
 Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
 Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln
 Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Cys Pro Gly
 Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala
 Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
 Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr;

またはレトロウイルスと結合する能力を有し、上記の配列に十分類似した
 アミノ酸配列および (ii) ヒトフィブロネクチンの I I I C S 結合ドメインの 1 部分に相当する、下記の式 (配列番号 2) で表される第 2 のアミノ酸配列 (C S - 1) :

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly
 Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr;

または原始前駆細胞および／または長期再定住（幹）細胞のような造血細

胞と結合する能力を有し、上記の配列に十分類似したアミノ酸配列を含む。

なお、上記の配列表の配列番号1で表されるポリペプチド(H-271)のレトロウイルス結合活性は濃度依存性を示し、実施例8に示すように高濃度下においては、CH-271と実質的に同等の活性を示す。すなわち、高濃度の有効量のH-271の存在下ではじめてレトロウイルスと標的細胞とは、少なくとも1分子以上のH-271に結合することが本発明により見い出された。

本発明で使用する機能性物質中のレトロウイルス結合部位とレトロウイルスとの強力な結合は、広範囲の細胞種においてウイルスを用いた治療法のための送達系を構築するために使用することができる。この目的のために、本発明で使用する機能性物質のレトロウイルス結合部位を含むポリペプチドは、構築物として標的細胞特異性を与える任意の細胞結合部位を含む物質と結合させる場合もあり、またはその細胞接着部位を含む物質と共存させる場合もある。すなわち、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質性と、細胞結合部位を有する機能性物質性物質は結合していても良く、また異なる分子として共存していても良い。

この方法は、各標的細胞用に特別のレトロウイルス細胞株を構築するこれまでの必要性を回避することができ、目的の標的細胞の種類により、最適の標的細胞結合部位を有する機能性物質の選択が容易になる。したがって、本発明の機能性物質を使用することにより、使用する標的細胞に特異的なターゲティングが容易に実施され、特にレトロウイルス結合部位を有する機能性物質性と、細胞結合部位を有する機能性物質性物質の混合物を使用する本発明の方法は、目的の標的細胞への目的の遺伝子導入効率の向上に、極めて有用である。また本発明が提供する新規機能性物質はレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率の向上させる方法および関連

の技術において、極めて有用である。

以下に実施例を挙げて、さらに詳しく本発明を説明するが、本発明は下記実施例の範囲のみに限定されるものではない。

実施例 1

(1) ウイルス上清液の調製

レトロウイルスプラスミド、PM5neoベクター (Exp. Hematol.、第23巻、第630～638頁、1995年) を含有するGP+E-86細胞 (ATCC CRL-9642) は10% FCS (ギブコ社製) ならびに50単位/mlのペニシリンおよび50 μg/mlのストレプトマイシン (共にギブコ社製) を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DME M、JRHバイオサイエンス社製) 中で培養した。なお、以降の操作に使用したDMEMはすべて50単位/mlのペニシリンおよび50 μg/mlのストレプトマイシンを含んだものである。PM5neoウイルス含有上清液は上記産生細胞をセミコンフルエントに生育させたプレート (10cm径のゼラチンコート細胞培養用ディッシュ、岩城硝子社製) に10% FCS を含有する4mlのDMEMを添加し、一夜培養した後に採取して調製した。採取した培地上清を0.45ミクロンのフィルター (ミリポア社製) でろ過してウイルス上清液ストックとし、使用するまでは-80°Cで保存した。

また、レトロウイルスプラスミド、TKNEOベクター (Blood、第78巻、第310～317頁、1991年) についてはGP+envAm-12細胞 (ATCC CRL-9641) を使用し、上記同様の操作を行ってTKNEOウイルス上清液を調製した。

(2) 上清液のウイルス力価の測定

上清液のウイルス力価はNIH/3T3細胞を使用して標準的な方法 (J. Virol.、第62巻、第1120～1124頁、1988年) に従って測定した。す

なわち、6 ウエルの組織培養プレートの 1 ウエルあたりに 2 0 0 0 個の N I H / 3 T 3 細胞 (ATCC CRL-1658) を含む DMEM を添加し、一夜培養した後、系列希釈したウイルス上清液と終濃度 7. 5 μ g / ml のヘキサジメトリン・ブロミド (ポリブレン: アルドリッチ社製) とを各ウエルに加えた。これを 37°C で 24 時間インキュベートした後、培地を終濃度 0. 75 mg / ml の G 4 1 8 (ギブコ社製) を含有するものと交換してさらにインキュベートを続けた。10 ~ 12 日後に生育した G 4 1 8 耐性 (G 4 1 8^r) コロニーをクリスタルバイオレットで染色しその数を記録した。ウエルあたりのコロニー数にウイルス上清液の希釈倍率を乗じた値より、上清 1 ml 当たりに含まれる感染性粒子数 (cfu / ml) を算出し、これを上清液の力価として以降の実験におけるウイルス上清液の添加量を決定した。

実施例 2

(1) フィブロネクチン由来ポリペプチドの調製

ヒトフィブロネクチン由来のポリペプチド、H-271 (配列表の配列番号 1 にそのアミノ酸配列を示す) は該ポリペプチドをコードする DNA を含む組換えプラスミド、pHD101 を含有する大腸菌、Escherichia coli HB101 / pHD101 (FERM BP-2264) より、米国特許第 5,198,423 号公報に記載の方法により調製した。

また、ポリペプチド CH-271 (配列表の配列番号 23 にそのアミノ酸配列を示す) は以下に示す方法により調製した。すなわち、大腸菌、Escherichia coli HB101 / pCH101 (FERM BP-2799) を用い、これを上記の公報に記載の方法で培養し、該培養物より CH-271 を得た。

また、ポリペプチド CH-296 (配列表の配列番号 24 にそのアミノ

酸配列を示す)は以下に示す方法により調製した。すなわち、大腸菌、Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800)を用い、これを上記の公報に記載の方法で培養し、該培養物よりCH-296を得た。

ポリペプチドC-274 (配列表の配列番号25にそのアミノ酸配列を示す)は以下に示す方法により調製した。すなわち、大腸菌、Escherichia coli JM109/pTF7221 (FERM BP-1915)を用い、これを米国特許第5,102,988号公報に記載の方法で培養し、該培養物よりC-274を得た。

さらに、ポリペプチドC277-CS1 (配列表の配列番号29にそのアミノ酸配列を示す)は以下に示す方法により調製した。すなわち、特開平3-284700号公報にFERM P-11339として記載され、現在はブタペスト条約の下、上記の茨城県つくば市東1丁目1番3号の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5723として寄託されている大腸菌、Escherichia coli HB101/pCS25 (原寄託日; 平成2年3月5日)を用い、これを上記公報に記載の方法で培養し、該培養物よりC277-CS1を得た。

(2) C-FGF・Aの調製

ポリペプチドC-FGF・A (配列表の配列番号4にそのアミノ酸配列を示す)は以下に示す方法に従って調製した。すなわち、上記ポリペプチドをコードするDNAを含有する組み換えプラスミド、pYMH-CF・Aを含む大腸菌、Escherichia coli JM109/pYMH-CF・A (FERM BP-5278)を100 µg/mlのアンピシリンを含む5mlのLB培地中、37°Cで8時間培養した。この前培養液を100 µg/mlのアンピシリン、1 mMのIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラク

トピラノシド) を含むLB培地500mlに接種し、37°Cで一夜培養した後集菌した。得られた菌体を1mM PMSF (フェニルメタンスルホニアムフルオリド)、0.05% ノニデットP-40を含む10mlのPBS (リン酸緩衝生理食塩水) に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した後、遠心分離を行って上清を得た。この上清の260nmにおける吸光度を測定して、これに上清の液量 (ml) を乗じた値を算出し、この値400に対して1mlの割合で5%ポリエチレンイミンを加えた後、遠心分離して上清を得た。この上清をあらかじめPBSで平衡化したハイトラップ-ヘパリンカラム (ファルマシア社製) にかけ、PBSで非吸着の画分を洗浄した後、0.5Mから2MのNaCl濃度勾配を持つPBSで吸着画分の溶出を行った。溶出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分析すると約47kdのポリペプチドを含む2つの画分が存在していたが、このうちの高NaCl濃度で溶出された方の画分を集めて1.5M NaClを含むPBSで平衡化したスーパーロース6カラム (ファルマシア社製) にかけた。溶出液をSDS-PAGEにより分析し、約47kdのポリペプチドを含む画分を集めて精製C-FGF・Aを調製し、以下の操作に使用した。

(3) C-FGF-CS1の調製

まず、ポリペプチドC-FGF-CS1 (配列表の配列番号5にそのアミノ酸配列を示す) を大腸菌を宿主として発現させるためのプラスミドを構築した。

Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) を培養し、得られた菌体よりアルカリ-SDS法によってプラスミドpCH102を調製した。このプラスミドを鋳型とし、プライマーM4 (宝酒造社製) 及び配列表の配列番号9に塩基配列を示すプライマーCS

1-Sを用いたPCR反応を行った後、エタノール沈殿によって反応液中の増幅DNA断片を回収した。得られたDNA断片をNhe I、Sal I(ともに宝酒造社製)で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い約970 bpのDNA断片をゲルより回収した。

次にEscherichia coli JM109/pYMH-CF·A(FERM BP-5278)を培養し、得られた菌体よりアルカリ-SDS法によってプラスミドpYMH-CF·Aを調製した。このプラスミドを鋳型とし、配列番号10に塩基配列を示すプライマーCF及び配列表の配列番号11に塩基配列を示すプライマーFNRを用いたPCR反応を行った後、エタノール沈殿によって反応液中の増幅DNA断片を回収した。得られたDNA断片をEco52 I(宝酒造社製)、Nhe Iで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い約320 bpのDNA断片をゲルより回収した。

上記のプラスミドpYMH-CF·AをEco52 I、Sal Iで消化した後にアガロースゲル電気泳動を行って単離される約4.1 kbのDNA断片を上記の約970 bpのDNA断片及び約320 bpのDNA断片と混合し、ライゲーションを行って得られる組換えプラスミドを大腸菌JM109に導入した。得られた形質転換体よりプラスミドを調製し、上記の3つのDNA断片が1分子ずつ含まれたものを選んでプラスミドpCFS100と命名した。また、プラスミドpCFS100で形質転換された大腸菌JM109をEscherichia coli JM109/pCFS100と命名した。プラスミドpCFS100はC-FGF·AのC末端側にフィブロネクチン由来のCS-1細胞接着領域を有し、FGFのC末端より2番目のリジンがアラニンに置換されたポリペプチド、C-FGF-CS1をコードしている。

ポリペプチドC-FGF-CS1は以下に示す方法に従って調製した。

すなわち、上記の大腸菌、Escherichia coli J M 1 0 9 / p C F S 1 0 0 を 1 0 0 μ g / ml のアンピシリンを含む 5 ml の L B 培地中、37°C で 8 時間培養した。この前培養液を 1 0 0 μ g / ml のアンピシリン、1 mM の IPTG を含む L B 培地 5 0 0 ml に接種し、37°C で一夜培養した後集菌した。得られた菌体を 0.5 M NaCl、1 mM PMSF、0.05% ノニデット P-40 を含む 10 ml の PBS (リン酸緩衝生理食塩水) に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した後、遠心分離を行って上清を得た。この上清をあらかじめ 0.5 M NaCl を含む PBS で平衡化したハイトラップ-ヘパリンカラムにかけ、0.5 M NaCl を含む PBS で非吸着の画分を洗浄した後、0.5 M から 2 M の NaCl 濃度勾配を持つ PBS で吸着画分の溶出を行った。溶出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、約 50 k d のポリペプチドを含む画分を集めて精製 C-FGF-CS1 を調製し、以下の操作に使用した。

こうして得られた精製 C-FGF-CS1 の N 末端から 5 番目までのアミノ酸配列を調べたところ、配列表の配列番号 5 に示されたアミノ酸配列のものと一致した。また、質量分析法によって測定された精製 C-FGF-CS1 の分子量も上記のアミノ酸配列から予想されるものと一致した。

(4) C 2 7 7 - C o 1 V の調製

ポリペプチド C 2 7 7 - C o 1 V (配列表の配列番号 6 にそのアミノ酸配列を示す) は以下に示す操作によって精製した。すなわち、上記ポリペプチドをコードする DNA を含有する組み換えプラスミド、pTF7520Co1V を含む大腸菌、Escherichia coli J M 1 0 9 / pTF7520Co1V (FERM BP-5277) を 1 0 0 μ g / ml のアンピシリンを含む 5 ml の L B 培地中、37°C で 6.5 時間培養した。この前培養液を 1 0 0 μ g / ml のアンピシリンを含む L B 培地 5 0 0 ml に接種し、3

7 °Cで培養した。660 nmにおける吸光度が0.6に達した時点でIPTGを終濃度1 mMになるように添加して一夜培養した後に集菌した。得られた菌体を1 mM EDTA、0.05% ノニデットP-40、2 mM PMSFを含む10 mlのPBSに懸濁し、超音波処理を10分間行って菌体を破碎した。この菌体破碎液を遠心分離して得た上清をPBSで平衡化したリソースQカラム（ファルマシア社製）にかけ、目的のポリペプチドを含む非吸着画分を得た。この画分をPBSで平衡化したハイトラップ-ヘパリンカラムにかけ、PBSで非吸着の画分を洗浄した後、0 Mから0.5 MのNaCl濃度勾配を持つPBSで吸着画分の溶出を行った。溶出液をSDS-PAGEにより分析し、48 kdのポリペプチドを含む画分を集めて精製C277-CoIVを調製し、以下の操作に使用した。

(5) CoIVの調製

まず、ポリペプチドCoIV（配列表の配列番号6にそのアミノ酸配列を示す）を大腸菌を宿主として発現させるためのプラスミドを構築した。Escherichia coli HB101/pTF7520CoIV (FERM BP-5277) を培養し、得られた菌体よりアルカリ-SDS法によってプラスミドpTF7520CoIVを調製した。このプラスミドをNcoI、BamHI（ともに宝酒造社製）で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、約0.58 kbのDNA断片をゲルより回収した。これがあらかじめNcoIとBamHIで消化しておいたプラスミドベクターpET8C（ノバジェン社製）と混合してライゲーションを行った。得られた組換えプラスミドを大腸菌BL21に導入して得られた形質転換体よりプラスミドを調製し、上記の約0.58 kb DNA断片1分子のみが含まれたものを選び、これをプラスミドpETCoIVと命名した。

上記のプラスミドpETCoIVで形質転換された大腸菌BL21、Es

Escherichia coli BL-21/pETCO1Vを50 μg/mlのアンピシリンを含む10 mlのLB培地中、37°Cで一夜培養した。この前培養液0.2 mlを50 μg/mlのアンピシリン、を含むLB培地100 mlに接種し、37°Cで培養した。600 nmの吸光度が0.4に達した時点でIPTGを終濃度1 mMとなるように添加し、一夜培養した後に集菌した。得られた菌体を1 mM EDTA、0.05% ノニデットP-40、10 μg/mlアプロチニン(aprotinin)、10 μg/ml ロイペプチn(leupeptin)、2 mM PMSFを含む5 mlのPBS(リン酸緩衝生理食塩水)に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した後、遠心分離を行って上清を得た。この上清をPBSで平衡化したハイトラップ-ヘパリンカラムにかけ、PBSで非吸着の画分を洗浄した後、0.5 MのNaClを含むPBSで吸着画分の溶出を行った。溶出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した結果、ほぼ単一な約18 kdのポリペプチドが確認された。こうして得られた精製CO1Vを以下の操作に使用した。

(6) H2-547の調製

ポリペプチドH2-547(配列表の配列番号13にそのアミノ酸配列を示す)を発現させるためのプラスミドは以下に示す操作に従って構築した。*Escherichia coli* HB101/pCH102(FERM BP-2800)を培養し、得られた菌体よりアルカリ-SDS法によってプラスミドpCH102を調製した。このプラスミドを鋳型とし、配列表の配列番号15に塩基配列を示すプライマー12Sと配列表の配列番号16に塩基配列を示すプライマー14Aとを用いたPCR反応の後、アガロースゲル電気泳動を行い、フィブロネクチンのヘパリン結合ポリペプチドをコードする約0.8 kbのDNA断片をゲルより回収した。得られたDNA断片をNcoI、BamHI(ともに宝酒造社製)で消化した後、NcoI、

BamH I で消化した pTV118N (宝酒造社製) と混合してライゲーションを行い、大腸菌 JM109 に導入した。得られた形質転換体よりプラスミドを調製し、上記の DNA 断片を含むプラスミドを選んでこれをプラスミド pRH1 とした。

プラスミドベクター pINIII-ompA1 (The EMBO Journal、第3巻、第2437～2442頁、1984年) を BamH I と Hincl II (宝酒造社製) とで消化し、リポプロテインターミネーター領域を含む約 0.9 kb の DNA 断片を回収した。これを BamH I と Hincl II で消化した上記のプラスミド pRH1 と混合してライゲーションを行い、lac プロモーター、ヘパリン結合ポリペプチドをコードする DNA 断片およびリポプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミド pRH1-T を得た。

プラスミド pRH1-T を Nhe I と Sca I (ともに宝酒造社製) で消化して得られる約 3.1 kb の DNA 断片と、Spe I (宝酒造社製) と Sca I で消化して得られる約 2.5 kb の DNA 断片をそれぞれ調製し、この 2 つをライゲーションさせることによって lac プロモーター、ヘパリン結合ポリペプチドが 2 個タンデムに連結されたポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム、およびリポプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミド pRH2-T を得た。上記のオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号 17 に示す。

ポリペプチド H2-547 は以下の方法により調製した。100 μg/ml のアンピシリンを含む 120 ml の LB 培地を入れた 500 ml バッフル付き三角フラスコを 4 本用意し、これに上記のプラスミド pRH2-T で形質転換された大腸菌 HB101、Escherichia coli HB101/pRH2-T を接種して 37°C で 1 晩培養した。培養液より遠心分離によって菌体を集め、40 ml の破碎用緩衝液 (50 mM トリス-HCl、1 mM EDTA)

T A、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM PMSF、pH 7.5)に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した。遠心分離を行って得られた上清を精製用緩衝液 (50 mM トリス-HCl、pH 7.5) で平衡化されたハイトラップ-ヘパリンカラム (ファルマシア社製) にかけた。同緩衝液でカラム内の非吸着画分を洗浄した後、0~1 M NaCl 濃度勾配を持つ精製用緩衝液で溶出を行った。溶出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、分子量約6万のポリペプチドを含む画分を集めて精製H2-547標品を得た。得られた標品の蛋白量をBCAプロテインアッセイリエージェント (ピアス社製) により、ウシ血清アルブミンをスタンダードとして測定したところ、約10 mgのH2-547が得られていた。

こうして得られた精製H2-547のN末端から5残基までのアミノ酸配列を調べたところ、配列表の配列番号17に示される塩基配列から予想されるH2-547のアミノ酸配列よりN末端のメチオニンが除去されたもの (配列表の配列番号13にその配列を示す) と一致した。また、質量分析法によって測定された精製H2-547の分子量は配列表の配列番号13に示されるアミノ酸配列から予想されるものと一致した。

(7) CH2-826の調製

ポリペプチドCH2-826 (配列表の配列番号14にそのアミノ酸配列を示す) を発現させるためのプラスミドは以下に示す操作に従って構築した。上記のプラスミドpCH102を鋳型とし、配列表の配列番号18に塩基配列を示すプライマーCLSと配列表の配列番号19に塩基配列を示すプライマーCLAとを用いたPCR反応の後、アガロースゲル電気泳動を行い、フィブロネクチンの細胞接着ポリペプチドをコードする約0.8 kbのDNA断片をゲルより回収した。得られたDNA断片をNco I、

B g I I I (宝酒造社製) で消化した後、N c o I 、B a m H I で消化した p T V 1 1 8 N と混合してライゲーションを行い、大腸菌 J M 1 0 9 に導入した。得られた形質転換体よりプラスミドを調製し、上記のDNA断片を含むプラスミドを選んでこれをプラスミド p R C 1 とした。このプラスミド p R C 1 をS p e I とS c a I で消化して得られる約2. 5 kbのDNA断片と、上記のプラスミド p R H 2 - T をN h e I とS c a I で消化して得られる約3. 9 kbのDNA断片とを混合してライゲーションを行い、細胞接着ポリペプチドのC末端にヘパリン結合ポリペプチドが2個タンデムに連結されたポリペプチドをコードするプラスミド p R C H 2 - T を得た。このポリペプチドをコードするプラスミド p R C H 2 - T 上のオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号2 0 に示す。

ポリペプチド C H 2 - 8 2 6 は実施例2 - (6) に記載のポリペプチド H 2 - 5 4 7 について用いられたものと同様の方法により調製した。ハイトラップヘパリンカラムの溶出液のうち分子量約9万のポリペプチドを含む画分を集めて精製 C H 2 - 8 2 6 標品を得た。

(8) H 2 S - 5 3 7 の調製

ポリペプチド H 2 S - 5 3 7 (配列表の配列番号3 0 にそのアミノ酸配列を示す) を発現させるためのプラスミドは以下に示す操作に従って構築した。上記のプラスミド p C H 1 0 2 を鋳型とし、配列表の配列番号3 1 に塩基配列を示すプライマー C S 1 S と、配列表の配列番号3 2 に塩基配列を示すプライマー C S 1 A とを用いた P C R 反応の後、アガロースゲル電気泳動を行ってフィブロネクチンの C S - 1 細胞接着領域をコードする約0. 1 kbのDNA断片をゲルより回収した。得られたDNA断片をN c o I 、B a m H I で消化した後、N c o I 、B a m H I で消化したプラスミドベクター p T V 1 1 8 N と混合してライゲーションを行い、大腸菌 J

M 1 0 9 に導入した。得られた形質転換体よりプラスミドを調製し、上記のDNA断片を含むプラスミドを選んでこれをプラスミドp R S 1とした。

プラスミドベクターp I N III-ompA₁をB a m H IとH i n c I Iとで消化し、リポプロテインターミネーター領域を含む約0. 9 k bのDNA断片を回収した。これをB a m H IとH i n c I Iとで消化した上記のプラスミドp R S 1と混合してライゲーションを行い、l a cプロモーター、C S - 1領域ポリペプチドをコードするDNA断片及びリポプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミドp R S 1 - Tを得た。

プラスミドp R S 1 - TをN h e IとS c a Iで消化して得られる約2. 4 k bのDNA断片と、プラスミドp R H 2 - TをS p e I、S c a I、P s t I（宝酒造社製）で消化して得られる約3. 3 k bのDNA断片をそれぞれ調製し、この2つをライゲーションさせることによってl a cプロモーター、タンデムに並んだ2個のヘパリン結合ポリペプチドのC末端側にさらにC S - 1領域が連結された構造のポリペプチドをコードするオープソリーディングフレーム、及びリポプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミドp R H 2 S - Tを得た。上記のオープソリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号3 2に示す。

ポリペプチドH 2 S - 5 7 3は実施例2 - (6)に記載のポリペプチドH 2 - 5 4 7について用いられたものと同様の方法により調製した。ハイトラップヘパリンカラムの溶出液のうち分子量約6万のポリペプチドを含む画分を集めて精製H 2 S - 5 7 3標品を得た。

(9) 機能性物質のプレートへの固定化

機能性物質を固定化されたプレート（6 ウエルの組織培養プレート、ファルコン社製）をレトロウイルスの細胞への感染実験に使用する場合には、以下に示す操作にしたがって固定化操作を行った。すなわち、上記の実施

例に記載の各種機能性物質を適當な濃度となるようにP B Sに溶解した溶液を1 ウエル（底面積9. 6 cm²）あたり2 ml添加し、紫外線の照射下においてプレートのふたを開けて1 時間、さらにふたを閉めて1 時間、室温でインキュベートした。次に機能性物質溶液を2 %のウシ血清アルブミン（B S A、ベーリンガー・マンハイム社製）を含むP B S 2 mlに交換してさらに30 分間、室温でインキュベートした後、25 mM ヘペス（H E P E S）を含むP B Sでプレートを洗浄した。B S Aを固定化した対照プレートは、上記の操作のうちポリペプチド溶液とのインキュベーションを省略して作製した。

なお、以降に示す実施例での遺伝子導入（ウイルス感染）実験においては、特に断らない限り上記の6 ウエルの組織培養プレートを使用し、プレートへの固定化に使用した機能性物質の濃度を示す場合には、ウエルの単位底面積あたりの機能性物質量をpmol/cm²（およびμg/cm²）を単位として記載する。たとえば上記のプレート（底面積9. 6 cm²）について48 μg/mlのH-271溶液2 mlを用いて固定化を行った場合には、「33 pmol/cm²（10 μg/cm²）のH-271を用いて固定化した」と記載する。また、遺伝子導入後の浮遊細胞（T F-1、H L-60）を培養する際に用いるCH-296を固定化したプレートは、48 pmol/cm²（3 μg/cm²）のCH-296溶液を用い、上記の操作によって固定化を行ったものである。以降の実施例において、標的細胞へのウイルス感染はすべてポリブレンを含有しない培地中で行った。また、使用するウイルス、細胞、培地等の量を示す場合には特に断らない限り1 ウエルあたりの量を記載する。

実施例3

（1）機能性物質の混合物を用いた遺伝子導入

細胞に結合する物質と、レトロウイルスに結合する物質とを混合してプレートに固定化した場合の遺伝子導入効率への影響を調べるために以下に示す実験を行った。まず、実施例2-(9)に記載の方法に従って32pmol/cm² (1.5 μg/cm²) のC-FGF・A、32pmol/cm² (1 μg/cm²) のC-274と32pmol/cm² (0.5 μg/cm²) のFGFとの混合物、および32pmol/cm² (0.5 μg/cm²) のFGF (ベクトン・ディッキンソン社製) のそれぞれを用い、各ポリペプチドをプレートに固定化した。これらのプレート、およびBSAを固定化した対照プレートのそれぞれに1000cfuのPM5ne0ウイルスを含む2mlのウイルス上清液を加えて37°C、30分間プレインキュベーションした後、PBSを用いてプレートを徹底的に洗浄した。このプレートに2000個のNIH/3T3細胞を含む2mlのDMEM培地を加え、ポリブレンの非存在下に37°C、2時間インキュベーションした後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理の後にプレートから剥がすことによってそれぞれ採取し、これらを合わせた。得られた細胞懸濁液を二分して一方をDMEM、もう一方を終濃度0.75mg/mlのG418を含むDMEMとともに37°Cで10日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G418を含まない培地で得られたコロニー数に対するG418耐性コロニー数の割合を遺伝子導入効率とし、その結果を図1に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。

図1に示されるように、レトロウイルスの感染時間を2時間とした場合にはFGF単独ではC-FGF・Aに比べて低い遺伝子導入効率しか得られないが、C-274とFGFの混合物を固定化したプレートを用いた場合には、この2つのポリペプチドが共有結合したC-FGF・Aを用いた場合と同様の効率でG418耐性コロニーが得られた。

詳細な検討を行うために、C-274のみ、およびFGFのみを固定化した場合とこれらの混合物を固定化した場合との比較を行った。すなわち32pmol/cm² (1 μg/cm²) のC-274、32pmol/cm² (0.5 μg/cm²) のFGF、および32pmol/cm²のC-274と32pmol/cm²のFGFとの混合物のそれぞれを用いて実施例2-(9)に記載の方法によってプレートへの固定化を行い、これらのプレートを用いて上記同様の操作でレトロウイルス感染への効果を調べた。得られた結果を図2に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。

図2に示されるようにC-274とFGFとの混合物を固定化したプレートを用いた場合にはFGFのみを固定化したものに比べて高い遺伝子導入効率を示した。またレトロウイルス結合部位を有しないC-274のみを固定化したプレートではG418耐性コロニーは得られなかった。以上の実験結果より、レトロウイルス結合部位を有するFGFに細胞結合部位を有するC-274を組み合わせることによってFGF単独で使用した場合に比べて高い感染効率が得られること、およびこのようなポリペプチドの組み合わせによる効果の発現には必ずしもポリペプチド鎖が共有結合で結ばれている必要がないことが示された。

(2) 機能性物質の混合物を用いた遺伝子導入

レトロウイルス結合部位を有するポリペプチドをC01Vに置き換えて、実施例3-(1)同様の実験を行った。本実験においてはC-274とC01Vとを種々のモル比で混合した場合を比較した。すなわち、330pmol/cm² (6 μg/cm²) のC01V、330pmol/cm² (10 μg/cm²) のC-274と330pmol/cm²のC01Vとの混合物 (C-274とC01Vのモル比は10:10)、100pmol/cm² (3 μg/cm²) のC-274と330pmol/cm²のC01Vとの混合物 (3:10)、33pmol/cm² のC-274と330pmol/cm²のC01Vとの混合物 (1:10) の各条件で実験を行った。

cm^2 (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の C-274 と 330 pmol/ cm^2 の CoIV との混合物 (1:10)、330 pmol/ cm^2 (16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の C277-CoIV、および 330 pmol/ cm^2 (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の C-274 のそれぞれを用いて実施例 2-(9) に記載の方法によってプレートへの固定化を行い、作製されたプレートを用いて上記同様の操作でレトロウイルス感染への効果を調べた。得られた結果を図 3 に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。

図 3 に示されるように感染時間を 2 時間とした場合には CoIV を固定化したプレート上での感染効率は C277-CoIV 固定化プレートの 1/2 以下であるが、CoIV とその 1/10 量 (分子数として) の C-274 の混合物を固定化したプレートを用いた場合には C277-CoIV と同等の感染効率が得られており、FGF の場合同様に C-274 分子のレトロウイルス感染の促進効果が確かめられた。なお、CoIV 分子に対する C-274 分子の割合が上昇した場合にはこの効果はむしろ低下し、等量の CoIV、C-274 を含む混合物を固定化した場合には CoIV のみを固定化した場合とほとんど差はみられない。

(3) 機能性物質の混合物を用いた遺伝子導入

細胞結合部位を有する物質と、レトロウイルス結合部位を有する物質とを混合してプレートへの固定化を行った場合の遺伝子導入効率への影響を調べるために以下に示す実験を行った。まず、実施例 2-(9) に記載の方法に従い、32 pmol/ cm^2 (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の C-274、333 pmol/ cm^2 (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の H-271、および 32 pmol/ cm^2 (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の C-274 と 333 pmol/ cm^2 (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の H-271 との混合物のそれぞれを用いてプレートへの固定化を行った。これらのプレートそれぞれに 1000 cfu の PM5neo ウィルスを含む 2 ml のウイルス上清

液を加え、37°C、30分間プレインキュベーションした後、PBSを用いてプレートを徹底的に洗浄した。このプレートに2000個のNIH/3T3細胞を含む2mlのD MEM培地を加えて37°C、2時間インキュベーションした後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理の後にプレートから剥がすことによってそれぞれ採取し、これらを合わせた。得られた細胞懸濁液を二分して一方をD MEM、もう一方を終濃度0.75mg/mlのG 418を含むD MEMとともに37°Cで10日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G 418を含まない培地で得られたコロニー数に対するG 418耐性コロニー数の割合を遺伝子導入効率とし、その結果を図4に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。

図4に示されるように、C-274とH-271の混合物（モル比1:10）を固定化したプレートを用いた場合にはH-271のみを固定化したものに比べて感染効率が大きく上昇した。なお、C-274のみを固定化したプレートでは遺伝子導入は見られなかった。

（4）C277-CS1を用いた遺伝子導入

細胞結合部位を有する物質としてC277-CS1を用い、これとレトロウイルスに結合部位を有する物質とを混合してプレートへの固定化を行った場合の感染効率への影響を調べるために以下に示す実験を行った。レトロウイルスに結合する物質としてはポリリジン [(Lys)_n、ポリ-L-リジン臭化水素酸塩、分子量5万～10万、和光純薬社製]、およびH-271の2種を用い、また細胞には浮遊細胞であるTF-1細胞（ATCC CRL-2003）を用いた。まず、実施例2-（9）に記載の方法に従い、以下に示す溶液でプレートへの固定化を行った。33pmol/cm² (1.1μg/cm²) のC277-CS1、133pmol/cm² (10μg/cm²)

のポリリジン、33 pmol/cm²のC277-CS1と133 pmol/cm²のポリリジンとの混合物、333 pmol/cm² (10 µg/cm²) のH-271、33 pmol/cm²のC277-CS1と333 pmol/cm²のH-271との混合物、および33 pmol/cm² (2.1 µg/cm²) のCH-296。これらのプレートそれぞれに1×10⁴cfu/のTKNEOウイルス、1×10⁴個のTF-1細胞を含むRPMI 1640培地 [5 ng/ml GM-CFS (ペトロ テック社製)、50単位/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシンを含むもの] を加えて37°Cで24時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理を行ってそれぞれ採取し、これらを合わせた。得られた細胞懸濁液のうちの1/5づつをCH-296を固定化したプレート2枚に移して24時間インキュベートした後、培地を一方は上記の培地、またもう一方は終濃度0.75 mg/mlのG418を含む上記の培地に交換して37°Cで8日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G418の存在下、非存在下に出現したコロニー数よりG418耐性コロニーの出現率 (遺伝子導入効率) を算出した。

図5に得られた結果を示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。なお図5の(a)はレトロウイルス結合性物質としてポリリジンを用いた場合、(b)はH-271を用いた場合である。細胞へ結合部位を有するC277-CS1をポリリジン、あるいはH-271と併用することにより、遺伝子導入効率はこれらのレトロウイルス結合性物質のみを固定化したプレートに比べて著しく上昇することが示された。

(5) エリスロポエチン誘導体ポリペプチドの調製

エリスロポエチンに対するレセプターを有する細胞への遺伝子導入に使

用するために、エリスロポエチンをグルタチオン- S-トランスフェラーゼとの融合ポリペプチドとした誘導体ポリペプチド、GST-Epoを調製した。配列表の配列番号34にGST-Epoのアミノ酸配列を示す。該配列中233番目～398番目のアミノ酸配列がエリスロポエチンに相当する。

まず、GST-Epoを発現させるためのプラスミドを以下に示す操作に従って構築した。ヒト胎児肝臓由来のcDNAライブラリー（クロンテック社製）を鋳型とし、プライマーEPF1、EPR1（配列表の配列番号35、36にそれぞれプライマーEPF1、EPR1の塩基配列を示す）を用いたPCRを行った。この反応液の一部をとってこれを鋳型とし、プライマーEPF2、EPR2（配列表の配列番号37、38にそれぞれプライマーEPF2、EPR2の塩基配列を示す）を用いて再度PCRを行った。この反応液より増幅DNA断片を回収し、これをEcoRI、BamHI（ともに宝酒造社製）で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行ってエリスロポエチンをコードする領域を含む約520bpのDNA断片を回収した。得られた断片をEcoRI（宝酒造社製）、BamHIで消化したプラスミドベクターpTV118N（宝酒造社製）と混合してライゲーションを行った後、大腸菌JM109に導入した。得られた形質転換体より上記のDNA断片を含むプラスミドを保持するものを選択し、プラスミドを調製してこれをプラスミドpEPOと命名した。次に、こうして得られたプラスミドpEPOをEcoRI、SalI（宝酒造社製）で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行って約0.5kpのDNA断片を回収した。この断片をEcoRI、SalIで消化したプラスミドベクターpGEX5X-3（ファルマシア社製）と混合してライゲーションを行った後、大腸菌JM109に導入した。得られた形質転換体より上記のDNA断片

を含むプラスミドを保持するものを選択し、このプラスミドを調製してこれをプラスミド p G S T E P O と命名した。該プラスミドにはベクター由来のグルタチオン- S -トランスフェラーゼの C 末端部分にエリスロポエチンのアミノ酸配列が挿入された融合ポリペプチド、G S T - E p o がコードされている。プラスミド p G S T E P O 上の G S T - E P O をコードする塩基配列を配列表の配列番号 3 9 に示す。

ポリペプチド G S T - E p o は以下に示す操作によって調製した。 1 0 0 μ g / ml のアンピシリンを含む 5 ml の L B 培地を 7 本準備し、それぞれに上記のプラスミド p G S T E P O で形質転換された大腸菌 J M 1 0 9 、 Escherichia coli J M 1 0 9 / p G S T E P O を接種して 3 7 °C で 1 晚培養した。次に、同様の培地 5 0 0 ml ずつを入れた 2 リットル容三角フラスコを 7 本用意し、これに上記の培養液 5 ml ずつを接種して 3 7 °C で培養した。培養開始より 3. 5 時間後に終濃度 1 mM となるように I P T G を添加し、さらに 3. 5 時間培養した。培養終了後、遠心分離を行って培養液より菌体を回収し、これを 1 mM P M S F および 1 mM E D T A を含む 1 0 0 ml の P B S に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した。得られた破碎液に 1 mM P M S F 、 1 mM E D T A および 2 % の Triton X - 1 0 0 を含む 1 0 0 ml の P B S を加え、氷上に 3 0 分間静置した後に遠心分離を行って上清を集めた。得られた上清を 0. 4 5 μ m のフィルター (ミリポア社製) でろ過した後、 P B S で平衡化したグルタチオン-セファロース 4 B カラム (ファルマシア社製、 3 ml) にアプライした。カラムを P B S で洗浄後、 1 0 mM グルタチオンを含む 5 0 mM トリス- H C l 、 p H 8. 0 を用いて溶出を行った。溶出液を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、分子量約 4. 4 万のポリペプチドを含む画分を集めてこれを P B S に対して透析した。透析後の試料を P B S で平衡化したり

ソースQカラム（ファルマシア社製、6ml）にアプライし、カラムをP B Sで洗浄後、0～0.6M NaCl濃度勾配を持つP B Sにより溶出を行った。上記同様にグルタチオンを含む50mM トリス-HCl、pH 8.0を用いて溶出を行った。分子量約4.4万のポリペプチドを含む画分を集め、これをセントリコン10（アミコン社製）を用いた限外ろ過によって約50μlまで濃縮し、さらにウルトラフリーC3GVSTR（ミリポア社製）を用いてろ過した後、ろ液をスーパーデックス200カラム（ファルマシア社製、P B Sにて平衡化）を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供した。分子量約4.4万のポリペプチドを含む溶出画分を集め、これをGST-Epoポリペプチド溶液として以降の実験に使用した。このGST-Epo溶液中には総タンパクの約50%のGST-Epoが含まれていた。

（6）エリスロポエチンレセプター発現細胞への遺伝子導入

細胞結合活性を有する機能性物質としてエリスロポエチンを使用した場合の遺伝子導入への効果を、エリスロポエチンのレセプターを発現するTF-1、およびエリスロポエチンのレセプターを発現しないHL-60（ATCC CCL-240）の2種の細胞を用いて調べた。なお、エリスロポエチンとしては上記のエリスロポエチン誘導体ポリペプチド（GST-Epo）を、また、レトロウイルスに結合する物質としてポリリジンをそれぞれ使用した。まず、実施例2-（9）に記載の方法に従って34pmol/cm²（1.5μg/cm²）相当のGST-Epo、133pmol/cm²（10μg/cm²）のポリリジンおよび34pmol/cm²のGST-Epoと133pmol/cm²のポリリジンとの混合物のそれぞれを用いてプレートへの固定化を行った。これらのプレートそれぞれに1×10⁴cfu/のTKNEOウイルス、および1×10⁴個の細胞を含む培地を加えて37℃で24時間イ

ンキュベーションした。なお培地としては、TF-1については RPMI 1640 培地 (5 ng/ml GM-CSF、50 単位/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシンを添加したもの)、HL-60 には RPMI 培地 (ニッスイ社製、10% FCS、50 単位/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシンを添加したもの) をそれぞれ使用した。インキュベーション終了後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理を行ってそれぞれ採取し、これらを合わせた。各プレートより得られた細胞懸濁液のうちの 1/5 づつを CH-296 を固定化したプレート 2 枚に移して 24 時間インキュベートした後、培地を一方は上記の培地、またもう一方は終濃度 0.75 mg/ml の G418 を含む上記の培地に交換して 37°C で 8 日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G418 の存在下、非存在下に出現したコロニー数より G418 耐性コロニーの出現率 (遺伝子導入効率) を算出した。

図 6 に結果を示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。図 6 (a) に示した TF-1 細胞の場合、ポリリジンのみを固定化したプレートにおいてもある程度の遺伝子導入が起こっているが、GST-EPO が共存する場合にはこれよりも高い遺伝子導入効率が得られた。一方、図 6 (b) に示した HL-60 細胞では、GST-EPO の共存による遺伝子導入効率の上昇は見られなかった。以上の結果より、エリスロポエチンを利用することにより、標的とする細胞に特異的な遺伝子導入が可能なことが示された。

さらに、レトロウイルス結合部位を有する物質を H2-547 にかえて TF-1 細胞への遺伝子導入実験を行った。実施例 2-(9) に記載の方法に従って 333 pmol/cm² (20 µg/cm²) の H2-547、34 pmol/cm² (1.5 µg/cm²) 相当の GST-EPO、および 34 pmol/cm² の

G S T - E p o と 3 3 3 pmol/cm² (20 μg/cm²) の H 2 - 5 4 7 との混合物のそれぞれを用いてプレートへの固定化を行った。同時に B S A を固定化したプレートを使用した対照実験も行った。図 7 に得られた結果を示す。図中、横軸はプレートに固定化された機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。図に示されるように H 2 - 5 4 7 を使用した場合にも G S T - E p o の共存によって T F - 1 細胞への遺伝子導入効率が向上することが示された。

(7) 機能性物質の混合物を固定化したビーズを用いた遺伝子導入細胞結合部位を有する物質とレトロウイルス結合部位を有する物質の両者を固定化したビーズを用いて、レトロウイルス感染効率を上げることが可能かどうかを調べた。

ポリペプチドを固定化したビーズは以下に示す方法により調製した。ビーズには粒子径 1.14 μm のポリスチレンビーズ（ポリビーズ ポリスチレン ミクロスフェア、ポリサイエンス社製）を用いた。上記ビーズの 2.5% 懸濁液 20 μl にエタノール 80 μl、および各種ポリペプチドの P B S 溶液 2 ml を加えて 4°C で一夜静置した後、B S A および P B S を加えて 4 ml の 1% B S A / P B S 懸濁液とした。この懸濁液より遠心分離によって回収したビーズを再度 5 ml の 1% B S A / P B S に懸濁し、室温で 1 時間静置してポリペプチド固定化ビーズの懸濁液を得た。ポリペプチド溶液としては 100 μg/ml C - 274、100 μg/ml H - 271、100 μg/ml CH - 271、100 μg/ml CH - 296、および 100 μg/ml H - 271 と 10 μg/ml C - 274 の混合物を用い、また対照として 2% B S A 溶液を使用して固定化を行ったビーズも同様に調製した。

調製されたポリペプチド固定化ビーズのうち 1/10 量を上記の懸濁液

より回収し、それぞれを2000個のTF-1細胞、1000cfuのTKNEOウイルス上清液とともに37°Cで一晩培養した。細胞を回収し、0.3% Bacto Agar(ディフコ社製)を含むRPMI培地[10%FCS、5ng/ml GM-CSF(ペトロテック社製)、50単位/mlペニシリン、50μg/mlストレプトマイシンを含むもの]に懸濁し、これを予め0.5% Bacto Agarを含む上記のRPMI培地で作製した35mmプレート上にまいた。なお、培地は0.75mg/ml G418を含むもの、含まないものの2通りを使用した。プレートを5% CO₂中、37°Cで14日間インキュベーションした後、G418の存在下、非存在下に出現したコロニーを計数し、G418耐性コロニーの出現率(遺伝子導入効率)を算出した。

図8に結果を示す。図中、横軸はビーズに固定化された機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。H-271とC-274の混合物を固定化したビーズを使用した場合には、H-271のみを固定化されたビーズ、同一分子中にレトロウイルス結合部位と細胞結合部位の両方を有するCH-271やCH-296がそれぞれ固定化されたビーズを用いた場合に比べても高い遺伝子導入効率が得られた。

実施例4

(1) FGF、C-FGF・Aを用いた遺伝子導入

FGF(ベクトン・ディッキンソン社製)、および配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(C-FGF・A)のレトロウイルス感染に対する影響をNIH/3T3細胞コロニー形成アッセイによって調べた。すなわち、実施例2-(9)に記載の方法により132pmol/cm²(2.25μg/cm²)のFGF、および133pmol/cm²(6.3μg/cm²)のC-FGF・Aのそれぞれを用いて固定化を行ったプレート、

およびB S Aを固定化した対照プレートのそれぞれに1000cfuのPM5neoウイルスを含む2mlのウイルス上清液を加えて37℃、30分間プレインキュベーションした後、PBSを用いてプレートを徹底的に洗浄した。このプレートに2000個のNIH/3T3細胞を含む2mlのDMEM培地を加えて37℃、24時間インキュベーションし、その後0.75mg/mlのG418を含む選択培地で10日間増殖させ、それに続いてコロニーを染色し、計数した。図9に得られた結果を示す。図中、横軸はプレートに固定化された機能性物質、縦軸は出現したG418耐性コロニー数をそれぞれ示す。

図9に示されるように、対照として使用したB S A固定化プレートではコロニーが出現しなかったのに対し、FGF、およびC-FGF・Aを固定化したプレートを用いた場合にはG418耐性コロニーの出現が確認された。この結果よりFGF、C-FGF・Aがレトロウイルス結合部位を有していること、および、フィブロネクチンの細胞結合部位ポリペプチドが付加されたC-FGF・Aは遺伝子導入においてFGFより優れた効果を有することが示された。

(2) プレートへの固定化に使用したC-FGF・A濃度と遺伝子導入効率との関係

種々の濃度のC-FGF・Aで固定化を行ったプレートでの遺伝子導入効率の比較を行った。すなわち実施例2-(9)に記載の方法に従い、0.521pmol/cm²(0.0247μg/cm²)～5.21pmol/cm²(0.247μg/cm²)のC-FGF・Aを用いて固定化を行ったプレート、およびB S A固定化プレート(対照プレート)を用い、実施例4-(1)と同様の操作でレトロウイルスの感染を行った。ウイルス感染処理後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプ

シン処理によってプレートから剥がすことによってそれぞれ採取し、両者を合わせた。得られた細胞懸濁液を2等分して一方をD M E M、他方を終濃度0.75mg/mlのG 4 1 8を含むD M E Mとともに37°Cで10日間培養した後、出現したコロニー数を数え、G 4 1 8を含まない培地で得られたコロニー数に対するG 4 1 8耐性コロニー数の割合を遺伝子導入効率とした。

得られた結果を図10に示す。図中、横軸はプレートの固定化操作に使用されたC-FGF・Aの濃度、縦軸は遺伝子導入効率をそれぞれ示す。なお、対照プレートでの実験結果はポリペプチド濃度0 μmol/cm²としてプロットした。図10に示されるように、固定化に使用したC-FGF・Aの濃度依存的に遺伝子導入効率の上昇が見られた。

(3) HL-60細胞への遺伝子導入

浮遊細胞であるHL-60細胞(ATCC CCL-240)へのレトロウイルスの感染に関して、各種のポリペプチドの存在の効果を以下に示す操作によって調べた。すなわち、100pmol/cm²のC-FGF・A(4.8 μg/cm²)、およびC-FGF-CS1(5.1 μg/cm²)を用いて実施例2-(9)に記載の方法で固定化を行ったプレート、およびBSAを固定化した対照プレートのそれぞれに1×10⁴cfu/のTKNEOウイルス、2000個のHL-60細胞を含む2mlのRPMI培地(10%FCS、50単位/mlのペニシリンおよび50 μg/mlのストレプトマイシンを添加して使用)を加えて37°Cで24時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はピペッティングによってそれぞれ採取し、これらを合わせた。得られた細胞懸濁液のうちの1/2づつをCH-296固定化プレートに移して24時間インキュベートした後、培地を終濃度0.

75 mg/mlのG 4 1 8を含む上記のR P M I 培地に交換し、37°Cで12日間培養し、出現したコロニー数を数えた。各ポリペプチドを使用して得られたG 4 1 8耐性コロニー数を図11に示す。図中、横軸はプレートに固定化された機能性物質、縦軸は出現したG 4 1 8耐性コロニー数をそれぞれ示す。

図11に示されるように、B S A固定化プレートに比較してC-F G F · AおよびC-F G F - C S 1を固定化したプレートではG 4 1 8耐性コロニー数が著しく上昇しており、これらのポリペプチドがH L - 6 0細胞へのレトロウイルスの感染を促進していることが示された。

(4) マウス骨髓細胞への遺伝子導入

骨髓細胞へのレトロウイルス感染に対するF G F、C-F G F · AおよびC-F G F - C S 1の効果を調べるため、以下に示す実験を行った。

6～8週齢のマウス (C 3 H / H e J) に150 mg/Kgの5-フルオロウラシル (5-F U、アムレスコ社製) を腹腔内投与し、その2日後に大腿骨および脛骨を摘出して骨髓を採取した。得られた骨髓をフィコールハイパク (密度 1.0875 g/ml、ファルマシア社製) を用いた密度勾配遠心分離に供し、低密度単核細胞画分を調製してこれをマウス骨髓細胞とした。

マウス骨髓細胞はルスキー (Luskey) 等の方法 (Blood、第80巻、第396～402頁、1992年) に従い、レトロウイルス感染前に予備刺激を行った。すなわち、20% F C S、100単位/ml組換えヒトインターロイキン-6 (rh I L - 6、アムジェン社製)、100 ng/ml組換えマウス幹細胞因子 (r m S C F、アムジェン社製)、50単位/mlのペニシリンおよび50 μg/mlのストレプトマイシンを含有するα-M E M (ギブコ社製) 中に 1×10^6 cells/mlの細胞密度で上記のマウス骨髓細胞を添加し、5

% CO₂中、37°Cで48時間インキュベートした。予備刺激した細胞は容器に付着したものを含め、ピペットを用いて吸引、採集した。

実施例2-(9)に記載の方法に従って236 μmol/cm² (4 μg/cm²) のFGF、169 pmol/cm² (8 μg/cm²) のC-FGF・A、あるいは159 μmol/cm² (8 μg/cm²) のC-FGF-CS1を用いて固定化を行ったプレート、およびBSA固定化プレート(対照プレート)に1×10⁶個の予備刺激した細胞と1×10⁴cfuのPM5neovirusとを含む上記の予備刺激に用いられた培地2mlを添加して37°Cでインキュベートした。2時間後に同量のウイルスを含む同様の培地(2ml)を新たにプレートに追加し、さらに22時間インキュベートを続けた。インキュベート終了後、非接着細胞はデカンテーションによって、またプレートに接着した細胞は細胞解離緩衝液(CDB、酵素を含まないもの、ギブコ社製)を使用してそれぞれ採集し、これらを合わせて同緩衝液で2回洗浄した後、細胞数を計数した。採集した細胞はHPP-CFC(High Proliferative Potential-Colony Forming Cells、高増殖能コロニー形成細胞)アッセイに供した。

HPP-CFCアッセイはBradley等の方法(Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.、第44巻、第287~293頁、1966年)に従って行った。培地には1%／0.66%重層軟寒天培地を使用し、終濃度1.5mg/mlのG418を含むもの、および含まないものの2通りを用いた。1ウエルあたりに1×10⁴個の感染細胞を添加し、10% CO₂中、37°Cで13日間インキュベートした。インキュベーション終了後、出現したコロニーを倒立顕微鏡で観察し、HPP-CFC由来の高密度コロニー(径0.5mm以上)を計数してG418耐性コロニーの出現率(遺伝子導入効率)を算出した。得られた結果を図12に示す。図中、横軸は使用した機

能性物質、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図12に示されるように、対照として使用したB S A固定化プレートではG 4 1 8耐性コロニーは出現していないのに対し、上記の各ポリペプチドを固定化したプレートを使用した場合にはG 4 1 8耐性コロニーが得られている。また、遺伝子導入効率はF G F、C-F G F・A、C-F G F-C S 1の順に高くなっている。細胞への結合活性を持つフィブロネクチン由来の細胞結合部位ポリペプチド、およびC S-1ポリペプチド部分の存在が骨髄細胞へのレトロウイルスの感染効率を高めた。

(5) プレートの固定化に使用したC 2 7 7-C o 1 V濃度と遺伝子導入効率との関係

種々の濃度のC 2 7 7-C o 1 Vを用いて固定化を行ったプレートでの遺伝子導入効率の比較を以下に示す操作により行った。0. 1 pmol/cm² (0. 1 μg/cm²) ~ 4 1 6 pmol/cm² (2 0 μg/cm²) のC 2 7 7-C o 1 Vを用い、実施例2-(9)に記載の方法によってプレートへの固定化を行った。これらのプレートのそれぞれに1 0 0 0 cfuのPM5neoウイルスを含む2mlのウイルス上清液を加えて37°C、30分間プレインキュベーションした後、PBSを用いてプレートを徹底的に洗浄した。このプレートに2 0 0 0個のN I H/3 T 3細胞を含む2mlのDMEM培地を加えて37°C、24時間インキュベーションした後、非付着細胞はテカシテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理の後にプレートから剥がすことによってそれぞれ採取し、これらを合わせた。得られた細胞懸濁液を二分し、一方にはDMEM、もう一方には終濃度0.75 mg/mlのG 4 1 8を含むDMEMを加えて37°Cで10日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G 4 1 8を含まない培地で得られたコロニー数に対するG 4 1 8耐性コロニー数の割合を遺伝子導入効率とし、その

結果を図13に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図13に示されるようにC277-CoIVを固定化したプレートを用いた場合、固定化に使用したC277-CoIVの濃度依存的に遺伝子導入効率が上昇した。

(6) ポリリジンを用いた遺伝子導入

ポリリジン [(Lys)_n] とレトロウイルスとの結合を以下に示す操作により調べた。ポリリジンとしてはポリ-L-リジン臭化水素酸塩(分子量5万～10万、和光純薬社製)を使用した。まず、133pmol/cm² (10μg/cm²) のPBS溶液としたポリリジンを用い、実施例2-(9)に記載の方法によってプレートへの固定化を行った。このプレート、およびBSAを固定化した対照プレートのそれぞれについて実施例4-(2)に記載の方法で遺伝子導入効率を評価した。その結果を図14に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図14に示されるようにBSAを用いた対照プレートではコロニーが見られなかったのに対し、ポリリジンを固定化したプレートではG418耐性コロニーの出現が確認された。このことはレトロウイルスがプレートに固定化されたポリリジンに結合するために、洗浄後のプレート上にレトロウイルスが残存していることを示している。

実施例5

(1) ポリペプチドの重合体を用いた遺伝子導入

ポリペプチドの重合体を用いた遺伝子導入は、各ポリペプチドをプレート上に固定しない状態で使用し、実施した。実施例2-(9)に記載の方法であらかじめBSAを固定化しておいたプレートに1000pfuのPM5neovirus、2000個のNIH/3T3細胞、および終濃度0.

6.3 nmol/mlの各ポリペプチド (H-271, CH-271, H2-547, CH2-826) を含む2mlのDMEM培地を加えて37°C、24時間インキュベートした後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理によってプレートから剥がすことによってそれぞれ採取し、両者を合わせた。また、対照としてポリペプチドを添加しないものについても同様の操作で導入実験を行った。得られた細胞懸濁液を2等分して一方をDMEM、他方を終濃度0.75mg/mlのG418を含むDMEMとともに37°Cで10日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G418を含まない培地で得られたコロニー数に対するG418耐性コロニー数の割合を遺伝子導入効率とし、その結果を図15に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図15に示されるように、H2-547存在下での遺伝子導入効率はCH-271存在下に比べて著しく高く、またCH2-826でもCH-271と同等あるいはそれ以上の遺伝子導入効率が得られた。

さらに詳細な検討を行った。ポリペプチドとしてCH-271, CH-296, H2-547を使用し、それぞれプレートあたり0.126nmol(終濃度0.063nmol/ml)、1.26nmol(終濃度0.63nmol/ml)の2通りの量で用いた他は上記と同様に操作した。図16に得られた結果を示す。図中、横軸は使用した機能性物質とその量、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図16に示されるようにH2-547を用いた場合には、用いた2通りのポリペプチド量のどちらでもCH-271, CH-296に比べて有意に高い遺伝子導入効率が得られた。

(2) H2S-573を用いたマウス骨髄細胞への遺伝子導入

骨髄細胞へのレトロウイルス感染に対するH 2 S - 5 7 3 の効果を調べるため、実施例4-（4）に記載の方法でマウス骨髄細胞への遺伝子導入を実験を行った。

マウス骨髄細胞は上記実施例に記載の方法に従って調製し、予備刺激を行った。なお、レトロウイルス感染時のプレートにはH 2 S - 5 7 3 [1 6 0 pmol/cm² (1 0 µg/cm²)] を固定化したものの他、CH - 2 9 6 [1 3 2 pmol/cm² (8. 3 µg/cm²)] を固定化したもの、および対照としてBSAを固定化したものを用いた。HPP - CFCアッセイにより得られた結果を図17に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図17に示されるように、対照として使用したBSA固定化プレートではG 4 1 8 耐性の高密度コロニーの出現は見られない。CH - 2 9 6 固定化プレートでは約50%の遺伝子導入効率が得られているが、H 2 S - 5 7 3 固定化プレートを用いた場合にはこれよりも高い効率でG 4 1 8 耐性の高密度コロニーが得られた。

実施例6

（1）非固定の機能性物質を用いた遺伝子導入

・ポリペプチドがプレート上に固定されない状態で共存する場合にレトロウイルスの感染効率に与える影響について以下のようにして調べた。すなわち、実施例2-（9）に記載の方法によりあらかじめBSAを固定化しておいたプレートに100cfuのPM5neoウイルス、2000個のNIH/3T3細胞、および終濃度10、40、250µg/ml（それぞれ0.158、0.632、3.950nmol/mlに相当）のCH - 2 9 6 を含む2mlのD MEM培地を加えて24時間インキュベーションした後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はト

リプシン処理の後にプレートから剥がすことによってそれぞれ採取し、両者を合わせた。得られた細胞懸濁液を10cm細胞培養用プレートに移して24時間インキュベートした後、培地を終濃度0.75mg/mlのG418を含むD MEMに交換してさらに10日間培養した。また、対照としてCH-296を添加しないもの、および32pmol/cm²(2μg/cm²)、127pmol/cm²(8μg/cm²)のCH-296を固定化したプレートを用いてこれにウイルス上清液と細胞を加えたものについて上記同様に操作した。こうして得られたG418耐性コロニーの数を数え、結果を表1にまとめた。

表1

| プレート | CH-296 | G418 ^r コロニー数 |
|----------------------------------|-----------|-------------------------|
| BSA | — | 5 |
| BSA | 10 μg/ml | 41 |
| BSA | 40 μg/ml | 66 |
| BSA | 250 μg/ml | 92 |
| CH-296(32pmol/cm ²) | — | 55 |
| CH-296(127pmol/cm ²) | — | 47 |

表1に示されるように溶液中に細胞、ウイルス、CH-296が共存する場合にはCH-296非存在下に比べてG418耐性コロニー数が大幅に増加した。また、その数はCH-296を固定化したプレートを用いた場合と同等か、もしくはそれよりも多かった。なお、BSA固定化プレートに上記の各濃度のCH-296溶液を添加してしばらく放置した後にプレートを洗浄してウイルス感染実験に用いた場合には、上記のCH-29

6を添加しない場合と同程度のG 4 1 8耐性コロニーしか得られないことから、B S A固定化プレートにはC H - 2 9 6が結合しないことがわかる。従って上記のC H - 2 9 6によるレトロウイルス感染促進効果はインキュベート中に溶液中のC H - 2 9 6がプレートに結合してもたらされたものではないと考えられる。

(2) 非固定の機能性物質を用いた遺伝子導入

ポリペプチドがプレート上に固定されない状態で共存する場合にレトロウイルスの感染効率に与える影響について以下のようにして調べた。すなわち、実施例2-(9)に記載の方法によりあらかじめB S Aを固定化しておいたプレートに1 0 0 0 cfuのP M 5 n e oウイルス、2 0 0 0 個のN I H / 3 T 3細胞、および終濃度1. 6 7 nmol / mlのC - F G F · A、C o I V、C 2 7 7 - C o I Vをそれぞれ含む2 mlのD M E M培地を加えて3 7 °C、2 4 時間インキュベーションした後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理の後にプレートから剥がすことによってそれぞれ採取し、両者を合わせた。得られた細胞懸濁液を二分して一方をD M E M、もう一方を終濃度0. 7 5 mg / mlのG 4 1 8を含むD M E Mとともに3 7 °Cで1 0 日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G 4 1 8を含まない培地で得られたコロニー数に対するG 4 1 8耐性コロニー数の割合を遺伝子導入効率とし、その結果を図18に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図18に示されるように、各ポリペプチドがウイルス感染時に共存する場合には高い遺伝子導入効率が得られており、これらのポリペプチドがプレート上に固定されない状態でもレトロウイルス感染の促進効果を有することが明らかとなった。

(3) 非固定の機能性物質を用いた浮遊細胞への遺伝子導入

非固定のポリペプチドが浮遊細胞への遺伝子導入効率に与える影響について以下のようにして調べた。すなわち、実施例2-(9)に記載の方法により 333 pmol/cm^2 ($10 \mu\text{g/cm}^2$) の H-271 を固定化したプレート、および BSA を固定化したプレートのそれぞれに $1 \times 10^4 \text{ cfu}/\text{ml}$ の TKNEO ウィルス、 1×10^4 個の TF-1 細胞を含む 2 ml の RPMI 1640 培地 [5 ng/ml GM-CFS、50 単位/ ml ペニシリン、 $50 \mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを含むもの] を加え、さらに BSA を固定化したプレートには終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ (1.67 nmol/ml) の H-271 を加えて 37°C で 24 時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理を行ってそれぞれ採取し、これらを合わせた。得られた細胞懸濁液のうちの $1/5$ づつを CH-296 を固定化したプレート 2 枚に移して 24 時間インキュベートした後、培地を一方は上記の培地、またもう一方は終濃度 0.75 mg/ml の G418 を含む上記の培地に交換して 37°C で 8 日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G418 の存在下、非存在下に出現したコロニー数より G418 耐性コロニーの出現率(遺伝子導入効率)を算出した。得られた結果を図 19 に示す。図中、横軸は使用した機能性物質とその使用形態、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図 19 に示されるように、非固定の H-271 を使用した場合には H-271 を固定化したプレートよりも高い遺伝子導入効率が得られており、TF-1 細胞への遺伝子導入に H-271 を使用する際には、非固定の状態の方が好ましいことが示された。

(4) ポリペプチドによるレトロウイルス感染促進の機構の解明

上記実施例に示された、非固定のポリペプチドによる細胞へのレトロウ

イルス感染の促進が細胞とポリペプチドとの結合、およびポリペプチドとレトロウイルスとの結合を介して起こっていることを確かめるために以下に示すような実験を行った。まず実施例2-(9)に記載の方法で調製したBSA固定化プレートに1000個のNIH/3T3細胞を含む2mlのDMEMを加え、37°Cで24時間生育させた。このプレートより培地を除き、それぞれ2mlの1. 67nmol/mlのH-271、CH-271、C-FGF・Aおよび対照としてPBSを加えて37°C、2.5時間インキュベートした後、25mMペプス(HEPES)を含むハンクス平衡塩類溶液(HBSS、Gibco社製)でプレートを洗浄した。次に1000cfuのPM5neoウイルスを含む2mlのウイルス上清液をプレートに加えて37°C、30分間インキュベートした後、PBSでプレートを洗浄した。このプレートに2mlのDMEMを加えて37°C、24時間インキュベートした後に非付着細胞はデカンテーションによって、またプレートに付着した細胞はトリプシン処理の後にプレートから剥がすことによってそれぞれ採取し、両者を合わせた。得られた細胞懸濁液を二分して一方をDMEM、もう一方を終濃度0.75mg/mlのG418を含むDMEMとともに37°Cで10日間培養し、出現したコロニー数を数えた。G418を含まない培地で得られたコロニー数に対するG418耐性コロニー数の割合を遺伝子導入効率とし、その結果を図20に示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率を示す。

図20に示されるようにプレート上の細胞を上記のポリペプチド溶液で処理した後にウイルス感染を行った場合には著しい感染効率の上昇が見られた。このことは細胞にポリペプチドが結合し、さらに細胞上のポリペプチドにレトロウイルスが結合することによってレトロウイルスの感染効率の上昇が起こることを示唆している。

さらに、添加するポリペプチドを、0. 29 nmol/mlのC-FGF・A、および0. 79 nmol/mlのCH-296に変更し、上記同様の実験を行った。図21にその結果を示す。図中、横軸は使用した機能性物質、縦軸は遺伝子導入効率を示す。図21に示されるようにC-FGF・A、およびCH-296を添加した場合には遺伝子導入効率の上昇が見られており、C-FGF・Aについて上記の活性が確認されるとともに、CH-296も同じ機構でレトロウイルスの感染を促進する活性を有することが示された。

実施例7

(1) 機能性物質を固定化したビーズを用いた遺伝子導入

機能性物質を固定化したビーズを用いてレトロウイルス感染効率を上げることが可能かどうかを以下に示す操作によって調べた。ビーズには粒子径1. 14 μ mのポリスチレンビーズ(ポリビーズ ポリスチレン ミクロスフェア、ポリサイエンス社製)を用いた。上記ビーズの2. 5%懸濁液20 μ lにエタノール80 μ l、および40 μ g/mlのCH-296溶液2mlを加えて4°Cで一夜静置した後、BSAおよびPBSを加えて4mlの1%BSA/PBS懸濁液とした。この懸濁液より遠心分離によって回収したビーズを再度5mlの1%BSA/PBSに懸濁し、室温で1時間静置してCH-296固定化ビーズの懸濁液を得た。なお対照としてCH-296溶液のかわりに2%BSAを使用して固定化操作を行ったビーズも同様に調製した。

上記のビーズ懸濁液のうち1/10量(0. 5ml)をとり、これより遠心分離によってビーズを回収した後、これに1000cfuのPM5neoウイルスを含むDMEMを加えて37°C、30分間インキュベートした。ビーズを1%BSA/PBSで2回洗浄後、2mlのDMEMに懸濁して1

mlをプレートに移し、 3×10^5 個のN I H／3 T 3細胞を含む1mlのD M E Mを加え、CO₂インキュベーター中、37℃で24時間インキュベートした。その後、培地を終濃度0.75mg/mlのG 4 1 8を含むD M E Mに交換し、さらに10日間培養し、出現したコロニーを染色、計数した。表2にその結果を示す。

表2に示されるようにCH-296を固定化したビーズを使用した場合には264個のG 4 1 8耐性コロニーが出現したのに対し、対照として用いたB S A固定化ビーズではまったく耐性コロニーは得られなかった。このことはCH-296をビーズ上に固定化した場合でもプレートの場合同様にレトロウイルスの感染効率を上げる効果を持つことを示している。

表2

| プレート | G418耐性コロニー数 |
|------------|-------------|
| BSA固定化（対照） | 0 |
| CH-296固定化 | 264 |

（2）機能性物質を固定化したビーズを用いたマウス骨髄細胞への遺伝子導入

機能性物質を固定化したビーズを用いてマウス骨髄細胞へのレトロウイルス感染効率を上げることが可能かどうかを以下に示す操作によって調べた。

マウス骨髄細胞は実施例4-（4）に記載の方法に従って調製し、予備刺激を行った。

実施例2-（9）に記載の方法に従ってB S Aを固定化したプレート、これに実施例7-（1）に記載の方法で調製したCH-296固定化ビー

ズのうち 1/10 量を添加したもののそれに 1×10^6 個の予備刺激した骨髓細胞と 1×10^4 cfu の PM5ne0 ウィルスとを含む上記の予備刺激に用いられた培地 2 ml を添加して 37°C でインキュベートした。2 時間後に同量のウィルスを含む同様の培地 (2 ml) を新たにプレートに追加し、さらに 22 時間インキュベートを続けた。インキュベート終了後、非接着細胞はデカンテーションによって、またプレートに接着した細胞は細胞解離緩衝液 (CDB、酵素を含まない、ギブコ社製) を使用してそれぞれ採集し、これらを合わせて同緩衝液で 2 回洗浄した後、細胞数を計数した。採集した細胞は実施例 4-(4) に記載の方法に従い HPP-CF C アッセイに供した。

結果を図 22 に示す。図中、横軸は使用された機能性物質とその使用形態、縦軸は遺伝子導入効率を示す。この結果より、CH-296 固定化ビーズを用いた場合でもマウス骨髓細胞へのレトロウィルス感染効率を上げることが可能であることがわかった。

実施例 8

(1) H-271、および CH-271 を用いた遺伝子導入 H-271 のレトロウィルス感染に対する影響を、H-271、および レトロウィルス感染の促進を示すことが知られている CH-271 を固定化したプレート中でウイルス上清液をプレインキュベーションした後、プレートを徹底的に洗浄し、そこに残存するウイルスの量を NIH/3T3 細胞コロニー形成アッセイで測定し、両者の結果を比較することにより評価した。すなわち、実施例 2-(9) 記載の方法により種々の濃度の H-271 [6.7 pmol/cm^2 ($2 \mu\text{g/cm}^2$) ~ 33.3 pmol/cm^2 ($10 \mu\text{g/cm}^2$)]、および CH-271 [6.7 pmol/cm^2 ($4 \mu\text{g/cm}^2$) ~ 33.3 pmol/cm^2 ($20 \mu\text{g/cm}^2$)] を用いて固定化操作を行ったプレートのそれぞれに

1000 cfu の PM5neo ウィルスを含む 2 ml のウィルス上清液を加えて 37°C、30 分間プレインキュベーションした後、PBS を用いてプレートを徹底的に洗浄した。このプレートに 2000 個の NIH/3T3 細胞を含む 2 ml の DMEM 培地を加えて 37°C、24 時間インキュベーションし、その後 0.75 mg/ml の G418 を含む選択培地の中で 10 日間増殖させ、それに続いてコロニーを染色し、計数した。その結果を図 23 に示す。図 23 は機能性物質と遺伝子導入効率の関係を示す図であり、横軸はポリペプチドの使用量、縦軸は G418 耐性コロニー数を示す。

図 23 に示されるように、CH-271 を用いた場合には固定化操作に用いたポリペプチド濃度にかかわらずほぼ同程度の G418 耐性コロニーが出現した。これに対し、H-271 では固定化の際のポリペプチド濃度を上げることにより濃度依存的に出現コロニー数が増加しており、333 pmol/cm² で固定化を行ったものでは CH-271 と同程度の G418 耐性コロニーが得られた。このことは十分量の H-271 を用いてプレートの固定化を行うことにより、CH-271 と実質上同等のウィルス感染効率が得られることを示している。

(2) C-FGF・A を用いた遺伝子導入

C-FGF・A ポリペプチドのレトロウィルス感染に対する影響を NIH/3T3 細胞コロニー形成アッセイによって調べた。すなわち、実施例 2-(9) に記載の方法により 127 pmol/cm² (6 μg/cm²) の C-FGF・A で固定化を行ったプレート、127 pmol/cm² (7.6 μg/cm²) の CH-271 で固定化を行ったプレート、127 pmol/cm² (8 μg/cm²) の CH-296 で固定化を行ったプレート、および BSA を固定化した対照プレートを使用した他は実施例 8-(1) と全く同じ方法で評価した。その結果を図 24 に示す。図 24 は機能性物質と遺伝子導入効率の関係を

示す図であり、横軸に使用した機能性物質およびB S Aを、縦軸にG 4 1 8耐性コロニー数を示す。

図24に示されるように、対照として使用したB S Aを固定化したプレートではコロニーが出現しなかった。一方、C-F G F・Aを固定化したプレートを用いた場合にはG 4 1 8耐性コロニーの出現が確認され、その数はCH-271、およびCH-296を用いたものと同程度であった。このことはFGF分子上にCH-271、およびCH-296と実質的に同等の機能を有するレトロウイルス結合部位が存在していることを示している。

(3) C-F G F-C S 1を用いた遺伝子導入

C-F G F-C S 1ポリペプチドのレトロウイルス感染に対する影響を以下に示す操作によって調べた。すなわち、それぞれ133 pmol/cm²のC-F G F-C S 1 (6.7 μg/cm²)、C-F G F・A (6.3 μg/cm²)、CH-271 (8 μg/cm²)、CH-296 (8.4 μg/cm²)を用いて実施例2-(9)に記載の方法でプレートの固定化を行い、これを用いて実施例8-(1)同様のNIH/3T3細胞コロニー形成アッセイを行った。その結果を図25に示す。図25は機能性物質と遺伝子導入効率の関係を示す図であり、横軸に使用した機能性物質を、縦軸にG 4 1 8耐性コロニー数を示す。

図25に示されるように、これら4種のポリペプチドを固定化したプレートではほぼ同数のG 4 1 8耐性コロニーが出現しており、C-F G F-C S 1分子も他のポリペプチドと実質的に同等のレトロウイルス結合活性を有していることを示している。

(4) C 2 7 7-C o 1 Vを用いた遺伝子導入

C 2 7 7-C o 1 Vポリペプチドのレトロウイルス感染に対する影響を、

124 pmol/cm² (6.4 μg/cm²) の C277-CoIV で固定化を行ったプレート、および BSA を固定化した対照プレートを用いて実施例 8-(1) と同様の方法で評価した。その結果を図 26 に示す。図 26 は機能性物質と遺伝子導入効率の関係を示す図であり、横軸に使用した機能性物質および BSA を、縦軸に G418 耐性コロニー数を示す。

図 26 に示されるように BSA を用いた対照プレートではコロニーが見られなかったのに対し、C277-CoIV を固定化したプレートでは G418 耐性コロニーの出現が確認された。このことは CoIV 分子上にレトロウイルス結合部位が存在しているために洗浄後のプレート上にレトロウイルスが残存していることを示している。

以上記載したごとく、本発明により、レトロウイルスを用いて標的細胞に効率よく遺伝子導入する方法が提供される。目的とする標的細胞に適した細胞結合性の物質を選択して本発明の方法を実施することにより、特殊なレトロウイルスベクターを必要とせず、簡便かつ高効率で遺伝子導入された標的細胞を取得することができる。遺伝子導入された細胞の脊椎動物への移植により、形質転換動物が簡便に作製され、本発明の方法は医療的分野、細胞工学的分野、遺伝子工学的分野、発生工学的分野等において有用である。また本発明の機能性物質、およびその混合物を含有する培地、標的細胞へのレトロウイルス介在遺伝子導入を行うためのキットも提供され、これらの培地、キットを用いることにより、レトロウイルスの配置、標的細胞への外来遺伝子の導入などを簡便に効率よく行うことができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質、および線維芽細胞増殖因子とフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペ

ペチドの混合物による標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図2は、線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子とフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドの混合物、およびフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドによる標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図3は、コラーゲンフラグメント、フィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドとコラーゲンフラグメントの混合物、コラーゲンフラグメントを含有する機能性物質、およびフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドによる標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図4は、フィブロネクチンフラグメント、およびフィブロネクチンフラグメントとフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドの混合物による標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図5は、フィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチド、ポリリジン、ポリリジンとフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドの混合物、フィブロネクチンフラグメント、およびフィブロネクチンフラグメントとフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドの混合物による標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図6は、エリスロポエチン誘導体、ポリリジン、およびエリスロポエチン誘導体とポリリジンの混合物による標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図7は、エリスロポエチン誘導体、フィブロネクチンフラグメント重合体、およびエリスロポエチン誘導体とフィブロネクチンフラグメント重合体の混合物による標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図8は、フィブロネクチンフラグメント固定化ビーズ、フィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチド固定化ビーズ、およびフィブロネクチンフ

ラグメントとフィブロネクチンの細胞接着部位ポリペプチドの混合物を固定化したビーズによる標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図9は、線維芽細胞増殖因子、および線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質による標的細胞への遺伝子導入を示すグラフである。

図10は、線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質の使用量と、標的細胞への遺伝子導入の関係を示すグラフである。

図11は、線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質による標的細胞への遺伝子導入を示すグラフである。

図12は、線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質による標的細胞への遺伝子導入効率を示すもう一つのグラフである。

図13は、コラーゲンフラグメントを含有する機能性物質の使用量と、標的細胞への遺伝子導入の関係を示すグラフである。

図14は、ポリリジンによる標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図15は、フィブロネクチンフラグメントおよびフィブロネクチンフラグメント重合体による標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図16は、フィブロネクチンフラグメントおよびフィブロネクチンフラグメント重合体による標的細胞への遺伝子導入効率を示すもうひとつのグラフである。

図17は、フィブロネクチンフラグメントおよびフィブロネクチンフラグメント重合体による標的細胞への遺伝子導入効率を示すさらにもうひとつのグラフである。

図18は、線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質、コラーゲンフラグメント、およびコラーゲンフラグメントを含有する機能性物質による標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図19は、フィブロネクチンフラグメントによる標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図20は、フィブロネクチンフラグメントおよび線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質による標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図21は、線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質およびフィブロネクチンフラグメントによる標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図22は、フィブロネクチンフラグメント固定化ビーズによる標的細胞への遺伝子導入効率を示すグラフである。

図23は、フィブロネクチンフラグメント使用量と、標的細胞への遺伝子導入の関係を示すグラフである。

図24は、線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質およびフィブロネクチンフラグメントによる標的細胞への遺伝子導入を示すグラフである。

図25は、線維芽細胞増殖因子を含有する機能性物質およびフィブロネクチンフラグメントによる標的細胞への遺伝子導入を示すもう1つのグラフである。

図26は、コラーゲンフラグメントを含有する機能性物質による標的細胞への遺伝子導入を示すグラフである。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：271

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ile | Pro | Ala | Pro | Thr | Asp | Leu | Lys | Phe | Thr | Gln | Val | Thr | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | |
| Thr | Ser | Leu | Ser | Ala | Gln | Trp | Thr | Pro | Pro | Asn | Val | Gln | Leu | Thr |
| | | | | | | 20 | | | 25 | | | 30 | | |
| Gly | Tyr | Arg | Val | Arg | Val | Thr | Pro | Lys | Glu | Lys | Thr | Gly | Pro | Met |
| | | | | | | 35 | | | 40 | | | 45 | | |
| Lys | Glu | Ile | Asn | Leu | Ala | Pro | Asp | Ser | Ser | Ser | Val | Val | Val | Ser |
| | | | | | | 50 | | | 55 | | | 60 | | |
| Gly | Leu | Met | Val | Ala | Thr | Lys | Tyr | Glu | Val | Ser | Val | Tyr | Ala | Leu |
| | | | | | | 65 | | | 70 | | | 75 | | |
| Lys | Asp | Thr | Leu | Thr | Ser | Arg | Pro | Ala | Gln | Gly | Val | Val | Thr | Thr |
| | | | | | | 80 | | | 85 | | | 90 | | |
| Leu | Glu | Asn | Val | Ser | Pro | Pro | Arg | Arg | Ala | Arg | Val | Thr | Asp | Ala |
| | | | | | | 95 | | | 100 | | | 105 | | |
| Thr | Glu | Thr | Thr | Ile | Thr | Ile | Ser | Trp | Arg | Thr | Lys | Thr | Glu | Thr |
| | | | | | | 110 | | | 115 | | | 120 | | |

Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr
 125 130 135
 Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 140 145 150
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr
 155 160 165
 Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser
 170 175 180
 Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr
 185 190 195
 Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 200 205 210
 Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
 215 220 225
 Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 230 235 240
 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
 245 250 255
 Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 260 265 270
 Thr

配列番号 : 2

配列の長さ : 25

配列の型 : アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Glu | Leu | Pro | Gln | Leu | Val | Thr | Leu | Pro | His | Pro | Asn | Leu | His |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| Gly | Pro | Glu | Ile | Leu | Asp | Val | Pro | Ser | Thr | | | | | |
| | | | | | | | | | | 20 | | | | 25 |

配列番号：3

配列の長さ：155

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ala | Gly | Ser | Ile | Thr | Thr | Leu | Pro | Ala | Leu | Pro | Glu | Asp |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| Gly | Gly | Ser | Gly | Ala | Phe | Pro | Pro | Gly | His | Phe | Lys | Asp | Pro | Lys |
| | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| Arg | Leu | Tyr | Cys | Lys | Asn | Gly | Gly | Phe | Phe | Leu | Arg | Ile | His | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | 45 |
| Asp | Gly | Arg | Val | Asp | Gly | Val | Arg | Glu | Lys | Ser | Asp | Pro | His | Ile |
| | | | | | | | | | | | | | | 60 |
| Lys | Leu | Gln | Leu | Gln | Ala | Glu | Glu | Arg | Gly | Val | Val | Ser | Ile | Lys |

| | | |
|---|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 |
| Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg | | |
| 80 | 85 | 90 |
| Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Glu | | |
| 95 | 100 | 105 |
| Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr | | |
| 110 | 115 | 120 |
| Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu | | |
| 125 | 130 | 135 |
| Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro | | |
| 140 | 145 | 150 |
| Met Ser Ala Lys Ser | | |
| 155 | | |

配列番号：4

配列の長さ：432

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | |
|---|----|----|----|
| Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu | | | |
| 20 | 25 | 30 | |

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
50 55 60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
65 70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
80 85 90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

| | | |
|---|-----|-----|
| 215 | 220 | 225 |
| Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys | | |
| 230 | 235 | 240 |
| Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg | | |
| 320 | 325 | 330 |
| Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu | | |
| 335 | 340 | 345 |
| Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu | | |
| 350 | 355 | 360 |
| Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr | | |
| 365 | 370 | 375 |
| Asp Glu Cys Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn | | |
| 380 | 385 | 390 |
| Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys | | |
| 395 | 400 | 405 |

| | | |
|---|-----|-----|
| Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln | | |
| 410 | 415 | 420 |
| Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser | | |
| 425 | 430 | |

配列番号：5

配列の長さ：457

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | |
|---|----|----|----|
| Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln | | | |
| 65 | 70 | 75 | |
| His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp | | | |
| 80 | 85 | 90 | |
| Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe | | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 95 | 100 | 105 |
| Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg | | |
| 110 | 115 | 120 |
| Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp | | |
| 125 | 130 | 135 |
| Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr | | |
| 140 | 145 | 150 |
| Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg | | |
| 155 | 160 | 165 |
| Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp | | |
| 170 | 175 | 180 |
| Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu | | |
| 185 | 190 | 195 |
| Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg | | |
| 200 | 205 | 210 |
| Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe | | |
| 215 | 220 | 225 |
| Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys | | |
| 230 | 235 | 240 |
| Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr | | |
| 275 | 280 | 285 |

Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro
290 295 300
Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly
305 310 315
Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg
320 325 330
Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu
335 340 345
Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu
350 355 360
Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr
365 370 375
Asp Glu Cys Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn
380 385 390
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys
395 400 405
Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln
410 415 420
Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Ala Ser Asp Glu Leu
425 430 435
Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu
440 445 450
Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
455

配列番号：6

配列の長さ：186

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ile | Arg | Gly | Leu | Lys | Gly | Thr | Lys | Gly | Glu | Lys | Gly | Glu | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gly | Phe | Pro | Gly | Phe | Lys | Gly | Asp | Met | Gly | Ile | Lys | Gly | Asp | Arg |
| | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
| Gly | Glu | Ile | Gly | Pro | Pro | Gly | Pro | Arg | Gly | Glu | Asp | Gly | Pro | Glu |
| | 35 | | | | | 40 | | | | | | 45 | | |
| Gly | Pro | Lys | Gly | Arg | Gly | Gly | Pro | Asn | Gly | Asp | Pro | Gly | Pro | Leu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | | 60 | | |
| Gly | Pro | Pro | Gly | Glu | Lys | Gly | Lys | Leu | Gly | Val | Pro | Gly | Leu | Pro |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | | 75 | | |
| Gly | Tyr | Pro | Gly | Arg | Gln | Gly | Pro | Lys | Gly | Ser | Ile | Gly | Phe | Pro |
| | 80 | | | | | 85 | | | | | | 90 | | |
| Gly | Phe | Pro | Gly | Ala | Asn | Gly | Glu | Lys | Gly | Gly | Arg | Gly | Thr | Pro |
| | 95 | | | | | 100 | | | | | | 105 | | |
| Gly | Lys | Pro | Gly | Pro | Arg | Gly | Gln | Arg | Gly | Pro | Thr | Gly | Pro | Arg |
| | 110 | | | | | 115 | | | | | | 120 | | |
| Gly | Glu | Arg | Gly | Pro | Arg | Gly | Ile | Thr | Gly | Lys | Pro | Gly | Pro | Lys |
| | 125 | | | | | 130 | | | | | | 135 | | |

Gly Asn Ser Gly Gly Asp Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Arg
 140 145 150
 Gly Pro Asn Gly Pro Gln Gly Pro Thr Gly Phe Pro Gly Pro Lys
 155 160 165
 Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro
 170 175 180
 Gly Gln Arg Gly Glu Thr
 185

配列番号：7

配列の長さ：464

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

| | | |
|---|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 |
| His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp | | |
| 80 | 85 | 90 |
| Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe | | |
| 95 | 100 | 105 |
| Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg | | |
| 110 | 115 | 120 |
| Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp | | |
| 125 | 130 | 135 |
| Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr | | |
| 140 | 145 | 150 |
| Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg | | |
| 155 | 160 | 165 |
| Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp | | |
| 170 | 175 | 180 |
| Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu | | |
| 185 | 190 | 195 |
| Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg | | |
| 200 | 205 | 210 |
| Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe | | |
| 215 | 220 | 225 |
| Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys | | |
| 230 | 235 | 240 |
| Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg | | |
| 245 | 250 | 255 |

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Gly Ile Arg Gly Leu Lys Gly
275 280 285
Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Asp Gly Phe Pro Gly Phe Lys Gly
290 295 300
Asp Met Gly Ile Lys Gly Asp Arg Gly Glu Ile Gly Pro Pro Gly
305 310 315
Pro Arg Gly Glu Asp Gly Pro Glu Gly Pro Lys Gly Arg Gly Gly
320 325 330
Pro Asn Gly Asp Pro Gly Pro Leu Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly
335 340 345
Lys Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Arg Gln Gly
350 355 360
Pro Lys Gly Ser Ile Gly Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ala Asn Gly
365 370 375
Glu Lys Gly Gly Arg Gly Thr Pro Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly
380 385 390
Gln Arg Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Pro Arg Gly
395 400 405
Ile Thr Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Asn Ser Gly Gly Asp Gly
410 415 420
Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Pro Asn Gly Pro Gln Gly
425 430 435
Pro Thr Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly

440 445 450

Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Thr

455 460

配列番号：8

配列の長さ：489

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
230 235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Gly Ile Arg Gly Leu Lys Gly
275 280 285
Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Asp Gly Phe Pro Gly Phe Lys Gly

| | | |
|---|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 |
| Asp Met Gly Ile Lys Gly Asp Arg Gly Glu Ile Gly Pro Pro Gly | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Pro Arg Gly Glu Asp Gly Pro Glu Gly Pro Lys Gly Arg Gly Gly | | |
| 320 | 325 | 330 |
| Pro Asn Gly Asp Pro Gly Pro Leu Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly | | |
| 335 | 340 | 345 |
| Lys Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Arg Gln Gly | | |
| 350 | 355 | 360 |
| Pro Lys Gly Ser Ile Gly Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ala Asn Gly | | |
| 365 | 370 | 375 |
| Glu Lys Gly Gly Arg Gly Thr Pro Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly | | |
| 380 | 385 | 390 |
| Gln Arg Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Pro Arg Gly | | |
| 395 | 400 | 405 |
| Ile Thr Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Asn Ser Gly Gly Asp Gly | | |
| 410 | 415 | 420 |
| Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Pro Asn Gly Pro Gln Gly | | |
| 425 | 430 | 435 |
| Pro Thr Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly | | |
| 440 | 445 | 450 |
| Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Ala Ser Asp | | |
| 455 | 460 | 465 |
| Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly | | |
| 470 | 475 | 480 |

Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

485

配列番号：9

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列：

AAACCATGGC AGTCAGCGAC GAGCTTCCCC AACTGG

36

配列番号：10

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列：

AATTGACAAA CCATCCATGG

20

配列番号：11

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成D N A）

配列：

CCATTAAAAT CAGCTAGCAG CAGACATTGG AAG 33

配列番号：1 2

配列の長さ：3 6

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成D N A）

配列：

TCTAGAGGAT CCTTAGCTAG CGCCTCTCTG TCCAGG 36

配列番号：1 3

配列の長さ：5 4 7

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln

5

10

15

Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val

20

25

30

| | | |
|---|-----|-----|
| 215 | 220 | 225 |
| Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu | | |
| 230 | 235 | 240 |
| Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Arg Lys Lys Thr Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser | | |
| 320 | 325 | 330 |
| Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val | | |
| . | 335 | 340 |
| Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln | | |
| 350 | 355 | 360 |
| Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala | | |
| 365 | 370 | 375 |
| Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg | | |
| 380 | 385 | 390 |
| Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro | | |
| 395 | 400 | 405 |

| | | |
|---|-----|-----|
| Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val | | |
| 410 | 415 | 420 |
| Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys | | |
| 425 | 430 | 435 |
| Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val | | |
| 440 | 445 | 450 |
| Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg | | |
| 455 | 460 | 465 |
| Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro | | |
| 470 | 475 | 480 |
| Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Ile Gly Arg Lys Lys Thr Ser | | |
| 545 | | |

配列番号：1 4

配列の長さ：8 2 6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Ser | Pro | Thr | Asp | Leu | Arg | Phe | Thr | Asn | Ile | Gly | Pro | Asp |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
| Thr | Met | Arg | Val | Thr | Trp | Ala | Pro | Pro | Pro | Ser | Ile | Asp | Leu | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 |
| Asn | Phe | Leu | Val | Arg | Tyr | Ser | Pro | Val | Lys | Asn | Glu | Glu | Asp | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 |
| Ala | Glu | Leu | Ser | Ile | Ser | Pro | Ser | Asp | Asn | Ala | Val | Val | Leu | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 |
| Asn | Leu | Leu | Pro | Gly | Thr | Glu | Tyr | Val | Val | Ser | Val | Ser | Ser | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 |
| Tyr | Glu | Gln | His | Glu | Ser | Thr | Pro | Leu | Arg | Gly | Arg | Gln | Lys | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 80 | | | | | 85 | | | | | 90 |
| Gly | Leu | Asp | Ser | Pro | Thr | Gly | Ile | Asp | Phe | Ser | Asp | Ile | Thr | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 95 | | | | | 100 | | | | | 105 |
| Asn | Ser | Phe | Thr | Val | His | Trp | Ile | Ala | Pro | Arg | Ala | Thr | Ile | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | 120 |
| Gly | Tyr | Arg | Ile | Arg | His | His | Pro | Glu | His | Phe | Ser | Gly | Arg | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 |
| Arg | Glu | Asp | Arg | Val | Pro | His | Ser | Arg | Asn | Ser | Ile | Thr | Leu | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 |
| Asn | Leu | Thr | Pro | Gly | Thr | Glu | Tyr | Val | Val | Ser | Ile | Val | Ala | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | 165 |

Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr
170 175 180
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
185 190 195
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg
200 205 210
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
215 220 225
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser
230 235 240
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val
245 250 255
Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile
260 265 270
Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Thr Ser Ala Ile Pro
275 280 285
Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu
290 295 300
Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg
305 310 315
Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile
320 325 330
Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met
335 340 345
Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 350 | 355 | 360 |
| Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn | | |
| 365 | 370 | 375 |
| Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr | | |
| 380 | 385 | 390 |
| Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly | | |
| 395 | 400 | 405 |
| Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln | | |
| 410 | 415 | 420 |
| Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu | | |
| 425 | 430 | 435 |
| Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp | | |
| 440 | 445 | 450 |
| Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile | | |
| 455 | 460 | 465 |
| Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser | | |
| 470 | 475 | 480 |
| Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn | | |
| 530 | 535 | 540 |

Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Ser Ala
545 550 555
Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr
560 565 570
Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly
575 580 585
Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys
590 595 600
Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly
605 610 615
Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys
620 625 630
Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu
635 640 645
Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr
650 655 660
Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile
665 670 675
Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro
680 685 690
Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr
695 700 705
Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
710 715 720
Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 725 | 730 | 735 |
| Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro | | |
| 740 | 745 | 750 |
| Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr | | |
| 755 | 760 | 765 |
| Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu | | |
| 770 | 775 | 780 |
| Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr | | |
| 785 | 790 | 795 |
| Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu | | |
| 800 | 805 | 810 |
| Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr | | |
| 815 | 820 | 825 |
| Ser | | |

配列番号：15

配列の長さ：3

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列：

AAACCATGGC AGCTAGCGCT ATTCCCTGCAC CAACTGAC

38

配列番号：16

配列の長さ： 3 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 1 本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： その他の核酸（合成DNA）

配列：

AAAGGATCCC TAACTAGTCT TTTTCCTTCC AATCAG 36

配列番号： 1 7

配列の長さ： 1 6 4 4

配列の型： 核酸

鎖の数： 2 本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： その他の核酸（人工のポリペプチドをコードするDNA）

配列：

| | |
|---|-----|
| ATGGCAGCTA GCGCTATTCC TGCACCAACT GACCTGAAGT TCACTCAGGT CACACCCACA | 60 |
| AGCCTGAGCG CCCAGTGGAC ACCACCCAAT GTTCAGCTCA CTGGATATCG AGTGCGGGTG | 120 |
| ACCCCCAAGG AGAAGACCGG ACCAATGAAA GAAATCAACC TTGCTCCTGA CAGCTCATCC | 180 |
| GTGGTTGTAT CAGGACTTAT GGTGGCCACC AAATATGAAG TGAGTGTCTA TGCTCTTAAG | 240 |
| GACACTTTGA CAAGCAGACC AGCTCAGGGT GTTGTACCCA CTCTGGAGAA TGTCAGCCCA | 300 |
| CCAAGAAGGG CTCGTGTGAC AGATGCTACT GAGACCACCA TCACCATTAG CTGGAGAAC | 360 |
| AAGACTGAGA CGATCACTGG CTTCCAAGTT GATGCCGTTC CAGCCAATGG CCAGACTCCA | 420 |
| ATCCAGAGAA CCATCAAGCC AGATGTCAGA AGCTACACCA TCACAGGTTT ACAACCAGGC | 480 |
| ACTGACTACA AGATCTACCT GTACACCTTG AATGACAATG CTCGGAGCTC CCCTGTGGTC | 540 |
| ATCGACGCCT CCACTGCCAT TGATGCACCA TCCAACCTGC GTTTCCTGGC CACCACACCC | 600 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|--------------|-------------|------------|-------------|------|
| AATTCCCTTGC | TGGTATCATG | GCAGCCGCCA | CGTGCCAGGA | TTACCGGCTA | CATCATCAAG | 660 |
| TATGAGAACG | CTGGGTCTCC | TCCCAGAGAA | GTGGTCCCTC | GGCCCCGCC | TGGTGTACAC | 720 |
| GAGGCTACTA | TTACTGGCCT | GGAACCGGGA | ACCGAATATA | CAATTTATGT | CATTGCCCTG | 780 |
| AAGAATAATC | AGAAGAGCGA | GCCCCTGATT | GGAAGGAAAA | AGACTAGCGC | TATTCCCTGCA | 840 |
| CCAAC TGACC | TGAAGTTCAC | TCAGGTACAC | CCCACAAGCC | TGAGCGCCCA | GTGGACACCA | 900 |
| CCCAATGTTG | AGCTCACTGG | ATATCGAGTG | CGGGTGACCC | CCAAGGAGAA | GACCGGACCA | 960 |
| ATGAAAGAAA | TCAACCTTGC | TCCTGACAGC | TCATCCGTGG | TTGTATCAGG | ACTTATGGTG | 1020 |
| GCCACCAAAT | ATGAAGTGAG | TGTCTATGCT | CTTAAGGACA | CTTGACAAG | CAGACCAGCT | 1080 |
| CAGGGTGTG | TCACCACTCT | GGAGAACATGTC | AGCCCACCAA | GAAGGGCTCG | TGTGACAGAT | 1140 |
| GCTACTGAGA | CCACCATCAC | CATTAGCTGG | AGAACCAAGA | CTGAGACGAT | CACTGGCTTC | 1200 |
| CAAGTTGATG | CCGTTCCAGC | CAATGGCCAG | ACTCCAATCC | AGAGAACCAT | CAAGCCAGAT | 1260 |
| GTCAGAAGCT | ACACCATCAC | AGGTTTACAA | CCAGGCACGTG | ACTACAAGAT | CTACCTGTAC | 1320 |
| ACCTTGAATG | ACAATGCTCG | GAGCTCCCCT | GTGGTCATCG | ACGCCCTCAC | TGCCATTGAT | 1380 |
| GCACCATCCA | ACCTGCGTTT | CCTGGCCACC | ACACCCAATT | CCTTGCTGGT | ATCATGGCAG | 1440 |
| CCGCCACGTG | CCAGGATTAC | CGGCTACATC | ATCAAGTATG | AGAAGCCTGG | GTCTCCTCCC | 1500 |
| AGAGAACGTGG | TCCCTCGGCC | CGGCCCTGGT | GTCACAGAGG | CTACTATTAC | TGGCCTGGAA | 1560 |
| CCGGGAACCG | AATATACAAT | TTATGTCATT | GCCCTGAAGA | ATAATCAGAA | GAGCGAGCCC | 1620 |
| CTGATTGGAA | GGAAAAAGAC | TAGT | | | | 1644 |

配列番号：18

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列：

AAACCATGGC AGCTAGCCCC ACTGACCTGC GATTCAC

37

配列番号：19

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列：

AAAAGATCTC TAACTAGTGG ATGGTTGTC AATTCTG

38

配列番号：20

配列の長さ：2481

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（人工のポリペプチドをコードするDNA）

配列：

ATGGCAGCTA GCCCCACTGA CCTGCGATTG ACCAACATTG GTCCAGACAC CATGCGTGTC 60

ACCTGGGCTC CACCCCCATC CATTGATTG ACCAACTTCC TGGTGCCTTA CTCACCTGTG 120

AAAAATGAGG AAGATGTTGC AGAGTTGTCA ATTTCTCCTT CAGACAATGC AGTGGTCTTA 180

ACAAATCTCC TGCCTGGTAC AGAATATGTA GTGAGTGTCT CCAGTGTCTA CGAACAAACAT 240

GAGAGCACAC CTCTTAGAGG AAGACAGAAA ACAGGTCTTG ATTCCCCAAC TGGCATTGAC 300

TTTTCTGATA TTACTGCCAA CTCTTTACT GTGCACTGGA TTGCTCCTCG AGCCACCATC 360

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| ACTGGCTACA | GGATCCGCCA | TCATCCCGAG | CACTTCAGTG | GGAGACCTCG | AGAAGATCGG | 420 |
| GTGCCCCACT | CTCGGAATTG | CATCACCCCTC | ACCAACCTCA | CTCCAGGCAC | AGAGTATGTG | 480 |
| GTCAGCATCG | TTGCTCTTAA | TGGCAGAGAG | GAAAGTCCCT | TATTGATTGG | CCAACAATCA | 540 |
| ACAGTTTCTG | ATGTTCCGAG | GGACCTGGAA | GTTGTTGCTG | CGACCCCCAC | CAGCCTACTG | 600 |
| ATCAGCTGGG | ATGCTCCTGC | TGTCACAGTG | AGATATTACA | GGATCACTTA | CGGAGAAACA | 660 |
| GGAGGAATA | GCCCTGTCCA | GGAGTTCACT | GTGCCTGGGA | GCAAGTCTAC | AGCTACCATC | 720 |
| AGCGGCCTTA | AACCTGGAGT | TGATTATACC | ATCACTGTGT | ATGCTGTAC | TGGCCGTGGA | 780 |
| GACAGCCCCG | CAAGCAGCAA | GCCAATTTC | ATTAATTACC | GAACAGAAAT | TGACAAACCA | 840 |
| TCCACTAGCG | CTATTCTGC | ACCAACTGAC | CTGAAGTTCA | CTCAGGTAC | ACCCACAAGC | 900 |
| CTGAGCGCCC | AGTGGACACC | ACCCAATGTT | CAGCTCACTG | GATATCGAGT | GCGGGTGACC | 960 |
| CCCAAGGAGA | AGACCGGACC | AATGAAAGAA | ATCAACCTTG | CTCCTGACAG | CTCATCCGTG | 1020 |
| GTTGTATCAG | GACTTATGGT | GGCCACCAAA | TATGAAGTGA | GTGTCTATGC | TCTTAAGGAC | 1080 |
| ACTTGACAA | GCAGACCAGC | TCAGGGTGT | GTCACCACTC | TGGAGAATGT | CAGCCCACCA | 1140 |
| AGAAGGGCTC | GTGTGACAGA | TGCTACTGAG | ACCACCATCA | CCATTAGCTG | GAGAACCAAG | 1200 |
| ACTGAGACGA | TCACTGGCTT | CCAAGTTGAT | GCCGTTCCAG | CCAATGGCCA | GAUTCCAATC | 1260 |
| CAGAGAACCA | TCAAGCCAGA | TGTCAGAACG | TACACCATCA | CAGGTTTACA | ACCAGGCACT | 1320 |
| GAECTACAAGA | TCTACCTGTA | CACCTTGAAT | GACAATGCTC | GGAGCTCCCC | TGTGGTCATC | 1380 |
| GACGCCTCCA | CTGCCATTGA | TGCACCATCC | AACCTGCGTT | TCCTGGCCAC | CACACCAAT | 1440 |
| TCCTTGCTGG | TATCATGGCA | GCCGCCACGT | GCCAGGATTA | CCGGCTACAT | CATCAAGTAT | 1500 |
| GAGAAGCCTG | GGTCTCCTCC | CAGAGAACG | GTCCCTCGGC | CCCGCCCTGG | TGTCACAGAG | 1560 |
| GCTACTATT | CTGGCCTGGA | ACCGGGAAC | GAATATACAA | TTTATGTCA | TGCCCTGAAG | 1620 |
| AATAATCAGA | AGAGCGAGCC | CCTGATTGGA | AGGAAAAAGA | CTAGCGCTAT | TCCTGCACCA | 1680 |
| ACTGACCTGA | AGTTCACTCA | GGTCACACCC | ACAAGCCTGA | GCGCCCAGTG | GACACCAACCC | 1740 |
| AATGTTCA | TCACTGGATA | TCGAGTGC | GTGACCCCCA | AGGAGAAC | CGGACCAATG | 1800 |
| AAAGAAATCA | ACCTTGCTCC | TGACAGCTCA | TCCGTGGTTG | TATCAGGACT | TATGGTGGCC | 1960 |

| | |
|---|------|
| ACCAAATATG AAGTGAGTGT CTATGCTCTT AAGGACACTT TGACAAGCAG ACCAGCTCAG | 1920 |
| GGTGTTGTCA CCACTCTGGA GAATGTCAGC CCACCAAGAA GGGCTCGTGT GACAGATGCT | 1980 |
| ACTGAGACCA CCATCACCAT TAGCTGGAGA ACCAAGACTG AGACGATCAC TGGCTTCAA | 2040 |
| GTTGATGCCG TTCCAGCCAA TGGCCAGACT CCAATCCAGA GAACCATCAA GCCAGATGTC | 2100 |
| AGAAGCTACA CCATCACAGG TTTACAACCA GGCACTGACT ACAAGATCTA CCTGTACACC | 2160 |
| TTGAATGACA ATGCTCGGAG CTCCCTGTG GTCATCGACG CCTCCACTGC CATTGATGCA | 2220 |
| CCATCCAACC TGCCTTCCT GGCCACCACA CCCAATTCCCT TGCTGGTATC ATGGCAGCCG | 2280 |
| CCACGTGCCA GGATTACCGG CTACATCATC AAGTATGAGA AGCCTGGGTC TCCTCCCAGA | 2340 |
| GAAGTGGTCC CTCGGCCCCG CCCTGGTGT ACAGAGGCTA CTATTACTGG CCTGGAACCG | 2400 |
| GGAACCGAAT ATACAATTAA TGTCATTGCC CTGAAGAATA ATCAGAAGAG CGAGCCCCTG | 2460 |
| ATTGGAAGGA AAAAGACTAG T | 2481 |

配列番号：21

配列の長さ：472

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Thr | Asp | Leu | Arg | Phe | Thr | Asn | Ile | Gly | Pro | Asp | Thr | Met | Arg |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| Val | Thr | Trp | Ala | Pro | Pro | Pro | Ser | Ile | Asp | Leu | Thr | Asn | Phe | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | 20 |
| | | | | | | | | | | | | | | 25 |
| | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| Val | Arg | Tyr | Ser | Pro | Val | Lys | Asn | Glu | Glu | Asp | Val | Ala | Glu | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | 35 |
| | | | | | | | | | | | | | | 40 |
| | | | | | | | | | | | | | | 45 |

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
50 55 60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
65 70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
80 85 90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

| | | |
|---|-----|-------|
| 230 | 235 | 240 |
| Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro | | |
| 320 | 325 | 330 |
| Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys | | |
| 335 | 340 | 345 |
| Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg | | |
| 350 | 355 | - 360 |
| Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro | | |
| 365 | 370 | 375 |
| Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile | | |
| 380 | 385 | 390 |
| Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp | | |
| 395 | 400 | 405 |
| Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys | | |
| 410 | 415 | 420 |

Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr
 425 430 435
 Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
 440 445 450
 Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
 455 460 465
 Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr
 470

配列番号：22

配列の長さ：457

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

| | | |
|---|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 |
| His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp | | |
| 80 | 85 | 90 |
| Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe | | |
| 95 | 100 | 105 |
| Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg | | |
| 110 | 115 | 120 |
| Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp | | |
| 125 | 130 | 135 |
| Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr | | |
| 140 | 145 | 150 |
| Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg | | |
| 155 | 160 | 165 |
| Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp | | |
| 170 | 175 | 180 |
| Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu | | |
| 185 | 190 | 195 |
| Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg | | |
| 200 | 205 | 210 |
| Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe | | |
| 215 | 220 | 225 |
| Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys | | |
| 230 | 235 | 240 |
| Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg | | |
| 245 | 250 | 255 |

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg
275 280 285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp
290 295 300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val
305 310 315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
320 325 330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr
335 340 345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro
350 355 360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu
365 370 375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln
380 385 390
Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys
395 400 405
Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly
410 415 420
Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr
425 430 435
Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro

440

445

450

Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr

455

配列番号：23

配列の長さ：549

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20

25

30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35

40

45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50

55

60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65

70

75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80

85

90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95

100

105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
230 235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp
275 280 285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp

| | | |
|---|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 |
| Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro | | |
| 320 | 325 | 330 |
| Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys | | |
| 335 | 340 | 345 |
| Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg | | |
| 350 | 355 | 360 |
| Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro | | |
| 365 | 370 | 375 |
| Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile | | |
| 380 | 385 | 390 |
| Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp | | |
| 395 | 400 | 405 |
| Ala Val Pro Ala Asn Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys | | |
| 410 | 415 | 420 |
| Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr | | |
| 425 | 430 | 435 |
| Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser | | |
| 440 | 445 | 450 |
| Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser | | |
| 455 | 460 | 465 |
| Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser | | |
| 470 | 475 | 480 |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr | | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg | | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr | | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser | | | |
| | 530 | 535 | 540 |
| Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr | | | |
| | 545 | | |

配列番号：24

配列の長さ : 5 7 4

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | |
|---|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 |
| Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln | | |
| 65 | 70 | 75 |
| His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp | | |
| 80 | 85 | 90 |
| Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe | | |
| 95 | 100 | 105 |
| Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg | | |
| 110 | 115 | 120 |
| Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp | | |
| 125 | 130 | 135 |
| Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr | | |
| 140 | 145 | 150 |
| Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg | | |
| 155 | 160 | 165 |
| Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp | | |
| 170 | 175 | 180 |
| Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu | | |
| 185 | 190 | 195 |
| Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg | | |
| 200 | 205 | 210 |
| Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe | | |
| 215 | 220 | 225 |
| Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys | | |
| 230 | 235 | 240 |

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp
275 280 285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
290 295 300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
305 310 315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro
320 325 330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
335 340 345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
350 355 360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
365 370 375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
380 385 390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp
395 400 405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys
410 415 420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 425 | 430 | 435 |
| Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser | | |
| 440 | 445 | 450 |
| Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser | | |
| 455 | 460 | 465 |
| Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser | | |
| 470 | 475 | 480 |
| Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp | | |
| 560 | 565 | 570 |
| Val Pro Ser Thr | | |

配列番号 : 25

配列の長さ : 274

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Thr | Asp | Leu | Arg | Phe | Thr | Asn | Ile | Gly | Pro | Asp | Thr | Met | Arg |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| Val | Thr | Trp | Ala | Pro | Pro | Pro | Ser | Ile | Asp | Leu | Thr | Asn | Phe | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| Val | Arg | Tyr | Ser | Pro | Val | Lys | Asn | Glu | Glu | Asp | Val | Ala | Glu | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | 45 |
| Ser | Ile | Ser | Pro | Ser | Asp | Asn | Ala | Val | Val | Leu | Thr | Asn | Leu | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | 60 |
| Pro | Gly | Thr | Glu | Tyr | Val | Val | Ser | Val | Ser | Ser | Val | Tyr | Glu | Gln |
| | | | | | | | | | | | | | | 75 |
| His | Glu | Ser | Thr | Pro | Leu | Arg | Gly | Arg | Gln | Lys | Thr | Gly | Leu | Asp |
| | | | | | | | | | | | | | | 90 |
| Ser | Pro | Thr | Gly | Ile | Asp | Phe | Ser | Asp | Ile | Thr | Ala | Asn | Ser | Phe |
| | | | | | | | | | | | | | | 105 |
| Thr | Val | His | Trp | Ile | Ala | Pro | Arg | Ala | Thr | Ile | Thr | Gly | Tyr | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | 120 |
| Ile | Arg | His | His | Pro | Glu | His | Phe | Ser | Gly | Arg | Pro | Arg | Glu | Asp |
| | | | | | | | | | | | | | | 135 |
| Arg | Val | Pro | His | Ser | Arg | Asn | Ser | Ile | Thr | Leu | Thr | Asn | Leu | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | 150 |
| Pro | Gly | Thr | Glu | Tyr | Val | Val | Ser | Ile | Val | Ala | Leu | Asn | Gly | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | 165 |
| 155 | | | | | | | | | 160 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Glu | Ser | Pro | Leu | Leu | Ile | Gly | Gln | Gln | Ser | Thr | Val | Ser | Asp |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | 170 | | | | 175 | | | 180 |
| Val | Pro | Arg | Asp | Leu | Glu | Val | Val | Ala | Ala | Thr | Pro | Thr | Ser | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 185 | | | 190 | | | 195 |
| Leu | Ile | Ser | Trp | Asp | Ala | Pro | Ala | Val | Thr | Val | Arg | Tyr | Tyr | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 200 | | | 205 | | | 210 |
| Ile | Thr | Tyr | Gly | Glu | Thr | Gly | Gly | Asn | Ser | Pro | Val | Gln | Glu | Phe |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 215 | | | 220 | | | 225 |
| Thr | Val | Pro | Gly | Ser | Lys | Ser | Thr | Ala | Thr | Ile | Ser | Gly | Leu | Lys |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 230 | | | 235 | | | 240 |
| Pro | Gly | Val | Asp | Tyr | Thr | Ile | Thr | Val | Tyr | Ala | Val | Thr | Gly | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 245 | | | 250 | | | 255 |
| Gly | Asp | Ser | Pro | Ala | Ser | Ser | Lys | Pro | Ile | Ser | Ile | Asn | Tyr | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 260 | | | 265 | | | 270 |
| Thr | Glu | Ile | Asp | | | | | | | | | | | |

配列番号：26

配列の長さ：1374

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（人工のポリペプチドをコードするDNA）

配列：

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ATGCCCACTG | ACCTGCGATT | CACCAACATT | GGTCCAGACA | CCATGCGTGT | CACCTGGGCT | 60 |
| CCACCCCCAT | CCATTGATTT | AACCAACTTC | CTGGTGCCTT | ACTCACCTGT | GAAAAATGAG | 120 |

| | |
|--|------|
| GAAGATGTTG CAGAGTTGTC AATTCTCCT TCAGACAATG CAGTGGTCTT AACAAATCTC | 180 |
| CTGCCTGGTA CAGAATATGT AGTGAGTGTC TCCAGTGTCT ACGAACACA TGAGAGCACA | 240 |
| CCTCTTAGAG GAAGACAGAA AACAGGTCTT GATTCCCCAA CTGGCATTGA CTTTCTGAT | 300 |
| ATTACTGCCA ACTCTTTAC TGTGCACTGG ATTGCTCCTC GAGCCACCAT CACTGGCTAC | 360 |
| AGGATCCGCC ATCATCCGA GCACTTCAGT GGGAGACCTC GAGAAGATCG GGTGCCAC | 420 |
| TCTCGGAATT CCATCACCCCT CACCAACCTC ACTCCAGGCA CAGAGTATGT GGTCAGCATC | 480 |
| GTTGCTCTTA ATGGCAGAGA GGAAAGTCCC TTATTGATTG GCCAACAAATC AACAGTTCT | 540 |
| GATGTTCCGA GGGACCTGGA AGTTGTTGCT GCGACCCCCA CCAGCCTACT GATCAGCTGG | 600 |
| GATGCTCCTG CTGTACAGT GAGATATTAC AGGATCACTT ACGGAGAAC AGGAGGAAT | 660 |
| AGCCCTGTCC AGGAGTTCAC TGTGCTGGG AGCAAGTCTA CAGCTACCAT CAGCGGCCTT | 720 |
| AAACCTGGAG TTGATTATAC CATCACTGTG TATGCTGTCA CTGGCCGTGG AGACAGCCCC | 780 |
| GCAAGCAGCA AGCCAATTTC CATTAATTAC CGAACAGAAA TTGACAAACC ATCCATGGCA | 840 |
| GCCGGGAGCA TCACCAACGCT GCCCGCCTTG CCCGAGGATG GCGGCAGCGG CGCCTTCCCG | 900 |
| CCCGGCCACT TCAAGGACCC CAAGCGGCTG TACTGCAAAA ACGGGGGCTT CTTCCTGCGC | 960 |
| ATCCACCCCG ACGGCCGAGT TGACGGGTC CGGGAGAAGA GCGACCCCTCA CATCAAGCTA | 1020 |
| CAACTTCAAG CAGAAGAGAG AGGAGTTGTG TCTATCAAAG GAGTGTGTGC TAACCGTTAC | 1080 |
| CTGGCTATGA AGGAAGATGG AAGATTACTG GCTTCTAAAT GTGTTACGGA TGAGTGTTC | 1140 |
| TTTTTTGAAC GATTGGAATC TAATAACTAC AATACTTACC GCTCAAGGAA ATACACCAAGT | 1200 |
| TGGTATGTGG CACTGAAACG AACTGGGCAG TATAAACTTG GATCCAAAAC AGGACCTGGG | 1260 |
| CAGAAAGCTA TACTTTTCT TCCAATGTCT GCTGCTAGCG ACGAGCTTCC CCAACTGGTA | 1320 |
| ACCCCTCCAC ACCCAATCT TCATGGACCA GAGATCTTGG ATGTTCCCTTC CACA | 1374 |

配列番号：27

配列の長さ：1416

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（人工のポリペプチドをコードするDNA）

配列：

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| CCCACTGACC | TGCGATTACAC | CAACATTGGT | CCAGACACCA | TGCGTGTACAC | CTGGGCTCCA | 60 |
| CCCCCATCCA | TTGATTTAAC | CAACTTCCTG | GTGCGTTACT | CACCTGTGAA | AAATGAGGAA | 120 |
| GATGTTGCAG | AGTTGTCAAT | TTCTCCTTCA | GACAATGCAG | TGGTCTTAAC | AAATCTCCTG | 180 |
| CCTGGTACAG | AATATGTAGT | GAGTGTCTCC | AGTGTCTACG | AACAACATGA | GAGCACACCT | 240 |
| CTTAGAGGAA | GACAGAAAAC | AGGTCTTGAT | TCCCCAACTG | GCATTGACTT | TTCTGATATT | 300 |
| ACTGCCAACT | CTTTTACTGT | GCACTGGATT | GCTCCTCGAG | CCACCATCAC | TGGCTACAGG | 360 |
| ATCCGCCATC | ATCCCGAGCA | CTTCAGTGGG | AGACCTCGAG | AAGATCGGGT | GCCCCACTCT | 420 |
| CGGAATTCCA | TCACCCCTCAC | CAACCTCACT | CCAGGCACAG | AGTATGTGGT | CAGCATCGTT | 480 |
| GCTCTTAATG | GCAGAGAGGA | AAGTCCCTTA | TTGATTGGCC | AACAATCAAC | AGTTTCTGAT | 540 |
| GTTCCGAGGG | ACCTGGAAGT | TGTTGCTGCG | ACCCCCACCA | GCCTACTGAT | CAGCTGGAT | 600 |
| GCTCCTGCTG | TCACAGTGAG | ATATTACAGG | ATCACTTACG | GAGAACACAGG | AGGAAATAGC | 660 |
| CCTGTCCAGG | AGTTCACTGT | GCCTGGGAGC | AAGTCTACAG | CTACCATCAG | CGGCCTTAAA | 720 |
| CCTGGAGTTG | ATTATACCAT | CACTGTGTAT | GCTGTCACTG | GCCGTGGAGA | CAGCCCCGCA | 780 |
| AGCAGCAAGC | CAATTCCAT | TAATTACCGA | ACAGAAATTG | ACAAACCATC | CATGGCTATT | 840 |
| CCTGCACCAA | CTGACCTGAA | GTTCACTCAG | GTCACACCCA | CAAGCCTGAG | CGCCCAGTGG | 900 |
| ACACCACCCA | ATGTTCAGCT | CACTGGATAT | CGAGTCGGG | TGACCCCCAA | GGAGAAGACC | 960 |
| GGACCAATGA | AAGAAATCAA | CCTTGCTCCT | GACAGCTCAT | CCGTGGTTGT | ATCAGGACTT | 1020 |
| ATGGTGGCCA | CCAAATATGA | AGTGAGTGTC | TATGCTCTTA | AGGACACTTT | GACAAGCAGA | 1080 |
| CCAGCTCAGG | GTGTTGTCAC | CACTCTGGAG | AATGTCAGCC | CACCAAGAAG | GGCTCGTGTG | 1140 |
| ACAGATGCTA | CTGAGACCAC | CATCACCATT | AGCTGGAGAA | CCAAGACTGA | GACGATCACT | 1200 |
| GGCTTCCAAG | TTGATGCCGT | TCCAGCCAAT | GGCCAGACTC | CAATCCAGAG | AACCATCAAG | 1260 |

| | |
|--|------|
| CCAGATGTCA GAAGCTACAC CATCACAGGT TTACAACCAAG GCACTGACTA CAAGATCTAC | 1320 |
| CTGTACACCT TGAATGACAA TGCTCGGAGC TCCCCTGTGG TCATCGACGC CTCCACTGCC | 1380 |
| ATTGATGCCAC CATCCAACCT GCGTTTCCTG GCCACC | 1416 |

配列番号：28

配列の長さ：35

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Arg | Gly | Thr | Pro | Gly | Lys | Pro | Gly | Pro | Arg | Gly | Gln | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | 15 |
| Gly | Pro | Thr | Gly | Pro | Arg | Gly | Glu | Arg | Gly | Pro | Arg | Gly | Ile | Thr |
| | | | | | | | | | | 25 | | | | 30 |
| Gly | Lys | Pro | Gly | Pro | | | | | | | | | | |
| | | | | 35 | | | | | | | | | | |

配列番号：29

配列の長さ：302

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
1 5 10 15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
50 55 60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
65 70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
80 85 90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu

| | | |
|---|-----|-----|
| 185 | 190 | 195 |
| Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg | | |
| 200 | 205 | 210 |
| Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe | | |
| 215 | 220 | 225 |
| Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys | | |
| 230 | 235 | 240 |
| Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Ser Thr | | |

配列番号：30

配列の長さ：573

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 5 | 10 | 15 |
| Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly | | |
| 80 | 85 | 90 |
| Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg | | |
| 95 | 100 | 105 |
| Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr | | |
| 110 | 115 | 120 |
| Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala | | |
| 125 | 130 | 135 |
| Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg | | |
| 140 | 145 | 150 |
| Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile | | |
| 155 | 160 | 165 |
| Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val | | |
| 170 | 175 | 180 |
| Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe | | |
| 185 | 190 | 195 |

Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro
200 205 210
Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly
215 220 225
Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr
230 235 240
Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile
245 250 255
Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile
260 265 270
Gly Arg Lys Lys Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
275 280 285
Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro
290 295 300
Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu
305 310 315
Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser
320 325 330
Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
335 340 345
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln
350 355 360
Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala
365 370 375
Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg

| | | |
|---|-----|-----|
| 380 | 385 | 390 |
| Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro | | |
| 395 | 400 | 405 |
| Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val | | |
| 410 | 415 | 420 |
| Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys | | |
| 425 | 430 | 435 |
| Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val | | |
| 440 | 445 | 450 |
| Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg | | |
| 455 | 460 | 465 |
| Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro | | |
| 470 | 475 | 480 |
| Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Ile Gly Arg Lys Lys Thr Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro | | |
| 560 | 565 | 570 |

Ser Thr Ser

配列番号：3 1

配列の長さ：3 7

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成D N A）

配列

AAACCATGGC AGCTAGCAAT GTCAGCCAC CAAGAAG

37

配列番号：3 2

配列の長さ：3 7

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成D N A）

配列

AAAGGATCCC TAACTAGTGG AAGGAACATC CAAGATC

37

配列番号：3 3

配列の長さ：1 7 2 2

配列の型：核酸

鎖の数：2

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（人工のポリペプチドをコードするDNA）

配列

| | |
|--|------|
| ATGGCAGCTA GCGCTATTCC TGCACCAACT GACCTGAAGT TCACTCAGGT CACACCCACA | 60 |
| AGCCTGAGCG CCCAGTGGAC ACCACCCAAT GTTCAGCTCA CTGGATATCG AGTGGGGGTG | 120 |
| ACCCCCAAGG AGAAGACCGG ACCAATGAAA GAAATCAACC TTGCTCCTGA CAGCTCATCC | 180 |
| GTGGTTGTAT CAGGACTTAT GGTGGCCACC AAATATGAAG TGAGTGTCTA TGCTCTTAAG | 240 |
| GACACTTTGA CAAGCAGACC AGCTCAGGGT GTTGTACCA CTCTGGAGAA TGTCAGCCCA | 300 |
| CCAAGAAGGG CTCGTGTGAC AGATGCTACT GAGACCACCA TCACCATTAG CTGGAGAACCC | 360 |
| AAGACTGAGA CGATCACTGG CTTCCAAGTT GATGCCGTT CAGCCAATGG CCAGACTCCA | 420 |
| ATCCAGAGAA CCATCAAGCC AGATGTCAGA AGCTACACCA TCACAGGTTT ACAACCAGGC | 480 |
| ACTGACTACA AGATCTACCT GTACACCTTG AATGACAATG CTCGGAGCTC CCCTGTGGTC | 540 |
| ATCGACGCCCT CCACTGCCAT TGATGCACCA TCCAACCTGC GTTCCCTGGC CACCACACCC | 600 |
| AATTCCCTGC TGGTATCATG GCAGCCGCCA CGTGCCAGGA TTACCGGCTA CATCATCAAG | 660 |
| TATGAGAAGC CTGGGTCTCC TCCCAGAGAA GTGGTCCCTC GGCCCCGCCG TGGTGTACAA | 720 |
| GAGGCTACTA TTACTGGCCT GGAACCGGGGA ACCGAATATA CAATTTATGT CATTGCCCTG | 780 |
| AAGAATAATC AGAAGAGCGA GCCCCTGATT GGAAGGAAAA AGACTAGCGC TATTCCCTGCA | 840 |
| CCAACTGACC TGAAGTTCAC TCAGGTACCA CCCACAAGCC TGAGCGCCCA GTGGACACCA | 900 |
| CCCAATGTT AGCTCACTGG ATATCGAGTG CGGGTGACCC CCAAGGAGAA GACCGGACCA | 960 |
| ATGAAAGAAA TCAACCTTGC TCCTGACAGC TCATCCGTGG TTGTATCAGG ACTTATGGTG | 1020 |
| GCCACCAAAT ATGAAGTGAG TGTCTATGCT CTTAAGGACA CTTTGACAAG CAGACCAGCT | 1080 |
| CAGGGTGTG TCACCACTCT GGAGAATGTC AGCCCACCAA GAAGGGCTCG TGTGACAGAT | 1140 |
| GCTACTGAGA CCACCATCAC CATTAGCTGG AGAACCAAGA CTGAGACGAT CACTGGCTTC | 1200 |
| CAAGTTGATG CCGTTCCAGC CAATGGCCAG ACTCCAATCC AGAGAACCAT CAAGCCAGAT | 1260 |
| GTCAGAAGCT ACACCATCAC AGGTTTACAA CCAGGCAGTG ACTACAAGAT CTACCTGTAC | 1320 |
| ACCTTGAATG ACAATGCTCG GAGCTCCCT GTGGTCATCG ACGCCTCCAC TGCCATTGAT | 1380 |

GCACCATCCA ACCTGCGTT CCTGGCCACC ACACCCAATT CCTTGCTGGT ATCATGGCAG 1440
CCGCCACGTG CCAGGATTAC CGGCTACATC ATCAAGTATG AGAAGCCTGG GTCTCCTCCC 1500
AGAGAAGTGG TCCCTCGGCC CCGCCCTGGT GTCACAGAGG CTACTATTAC TGGCCTGGAA 1560
CCGGGAACCG AATATACAAT TTATGTCATT GCCCTGAAGA ATAATCAGAA GAGCGAGCCC 1620
CTGATTGGAA GGAAAAAGAC TAGCGACGAG CTTCCCCAAC TGGTAACCCCT TCCACACCCC 1680
AATCTTCATG GACCAGAGAT CTTGGATGTT CCTTCCACTA GT 1722

配列番号：3 4

配列の長さ : 4 1 2

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列

| | | | |
|---|----|----|----|
| Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln | | | |
| | 5 | 10 | 15 |
| Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile | | | |
| | 65 | 70 | 75 |
| Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala | | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 80 | 85 | 90 |
| Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly | | |
| 95 | 100 | 105 |
| Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val | | |
| 110 | 115 | 120 |
| Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp | | |
| 125 | 130 | 135 |
| Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His | | |
| 140 | 145 | 150 |
| Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met | | |
| 155 | 160 | 165 |
| Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys | | |
| 170 | 175 | 180 |
| Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser | | |
| 185 | 190 | 195 |
| Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe | | |
| 200 | 205 | 210 |
| Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Ile Glu Gly Arg | | |
| 215 | 220 | 225 |
| Gly Ile Pro Arg Asn Ser Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp | | |
| 230 | 235 | 240 |
| Ser Arg Val Leu Gln Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn | | |
| 260 | 265 | 270 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Thr | Val | Pro | Asp | Thr | Lys | Val | Asn | Phe | Tyr | Ala | Trp | Lys | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 275 | | | | | | | | | 280 | | | | | 285 |
| Met | Glu | Val | Gly | Gln | Gln | Ala | Val | Glu | Val | Trp | Gln | Gly | Leu | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 290 | | | | | | | | | 295 | | | | | 300 |
| Leu | Leu | Ser | Glu | Ala | Val | Leu | Arg | Gly | Gln | Ala | Leu | Leu | Val | Asn |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 305 | | | | | | | | | 310 | | | | | 315 |
| Ser | Ser | Gln | Pro | Trp | Glu | Pro | Leu | Gln | Leu | His | Val | Asp | Lys | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 320 | | | | | | | | | 325 | | | | | 330 |
| Val | Ser | Gly | Leu | Arg | Ser | Leu | Thr | Thr | Leu | Leu | Arg | Ala | Leu | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 335 | | | | | | | | | 340 | | | | | 345 |
| Ala | Gln | Lys | Glu | Ala | Ile | Ser | Pro | Pro | Asp | Ala | Ala | Ser | Ala | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 350 | | | | | | | | | 355 | | | | | 360 |
| Pro | Leu | Arg | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Thr | Phe | Arg | Lys | Leu | Phe | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 365 | | | | | | | | | 370 | | | | | 375 |
| Val | Tyr | Ser | Asn | Phe | Leu | Arg | Gly | Lys | Leu | Lys | Leu | Tyr | Thr | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 380 | | | | | | | | | 385 | | | | | 390 |
| Glu | Ala | Cys | Arg | Thr | Gly | Asp | Arg | Leu | Ala | Met | Asp | Pro | Leu | Glu |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 395 | | | | | | | | | 400 | | | | | 405 |
| Ser | Thr | Arg | Ala | Ala | Ala | Ser | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 410 | | | | | | | | | | | | | | |

配列番号：35

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列

GCTCCCTCTG GGCCCTCCCAG TCCT

24

配列番号：36

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列

GTTGGTGAGG GAGGTGGTGG ATAT

24

配列番号：37

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列

GGCCTCCCGA ATTCCGGTGC CCCACCAACGC CTC

33

配列番号：38

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（合成DNA）

配列

CCCACGTGGA TCCATGGCTA ATCTGTCCCC TGT

33

配列番号：39

配列の長さ：1239

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸（人工のポリペプチドをコードするDNA）

配列

| | |
|--|-----|
| ATGTCCCCTA TACTAGTTA TTGGAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TCGACTTCTT | 60 |
| TTGGAATATC TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTGTATG AGCGCGATGA AGGTGATAAA | 120 |
| TGGCGAAACA AAAAGTTGA ATTGGGTTTG GAGTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT | 180 |
| GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGGCC ATCATACTT ATATAGCTGA CAAGCACAAAC | 240 |
| ATGTTGGGTG GTTGTCCAAA AGAGCGTGCA GAGATTCAA TGCTTGAAGG AGCGGTTTG | 300 |
| GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA TATAGTAAAG ACTTTGAAAC TCTCAAAGTT | 360 |
| GATTTCTTA GCAAGCTACC TGAAATGCTG AAAATGTTCG AAGATCGTTT ATGTCATAAA | 420 |
| ACATATTAA ATGGTGATCA TGTAACCCAT CCTGACTTCA TGTTGTATGA CGCTCTTGAT | 480 |
| GTTGTTTAT ACATGGACCC AATGTGCCTG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTAAA | 540 |
| AAACGTATTG AAGCTATCCC ACAAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA | 600 |
| TGGCCTTTGC AGGGCTGGCA AGCCACGTTT GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT | 660 |

| | |
|--|------|
| CTGATCGAAG GTCGTGGAT CCCCAGGAAT TCCGGTGCCT CACCACGCCT CATCTGTGAC | 720 |
| AGCCGAGTCC TGCAGAGGTA CCTCTTGGAG GCCAAGGAGG CCGAGAATAT CACGACGGC | 780 |
| TGTGCTGAAC ACTGCAGCTT GAATGAGAAT ATCACTGTCC CAGACACCAA AGTTAATTTC | 840 |
| TATGCCTGGA AGAGGATGGA GGTGGGCAG CAGGGCTAG AAGTCTGGCA GGGCCTGGCC | 900 |
| CTGCTGTCGG AAGCTGTCCT GCGGGGCCAG GCCCTGTTGG TCAACTCTTC CCAGCCGTGG | 960 |
| GAGCCCCCTGC AGCTGCATGT GGATAAAGCC GTCAGTGGCC TTCGCAGCCT CACCACTCTG | 1020 |
| CTTCGGGCTC TGGGAGCCCA GAAGGAAGCC ATCTCCCCTC CAGATGCGGC CTCAGCTGCT | 1080 |
| CCACTCCGAA CAATCACTGC TGACACTTTC CGCAAACCTCT TCCGAGTCTA CTCCAATTTC | 1140 |
| CTCCGGGAA AGCTGAAGCT GTACACAGGG GAGGCCTGCA GGACAGGGGA CAGATTAGCC | 1200 |
| ATGGATCCTC TAGAGTCGAC TCGAGCGGCC GCATCGTGA | 1239 |

請 求 の 範 囲

1. レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法において、レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質との混合物の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることを特徴とするレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法。
2. レトロウイルス結合部位を有する機能性物質が、フィブロネクチンのヘパリン-ⅠⅠ結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項1記載の方法。
3. 標的細胞結合部位を有する機能性物質が、標的細胞と特異的に結合するリガンドである請求項1記載の方法。
4. リガンドが、細胞接着性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗体、糖鎖、炭水化物または代謝物である請求項3記載の方法。
5. 細胞接着性のタンパク質が、フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドである請求項4記載の方法。
6. フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドが、VLA-5および/またはVLA-4への結合領域ポリペプチドである請求項5記載の方法。
7. リガンドが、エリスロポエチンである請求項4記載の方法。
8. 機能性物質が固定化されている請求項1～7いずれか1項記載の方法。
9. レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質との混合物を含有するレトロウ

イルスによる標的細胞への遺伝子導入に使用する標的細胞の培養培地。

10. レトロウイルス結合部位を有する機能性物質が、フィブロネクチンのヘパリン－II結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項9記載の培養培地。

11. 標的細胞結合部位を有する機能性物質が、標的細胞と特異的に結合するリガンドである請求項9記載の培養培地。

12. リガンドが、細胞接着性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗体、糖鎖、炭水化物または代謝物である請求項11記載の培養培地。

13. 細胞接着性のタンパク質が、フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドである請求項12記載の培養培地。

14. フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドが、VLA-5および／またはVLA-4への結合領域ポリペプチドである請求項13記載の培養培地。

15. リガンドが、エリスロポエチンである請求項12記載の培養培地。

16. 機能性物質が固定化されている請求項9～15いずれか1項記載の培養培地。

17. レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と、標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質との混合物と接触したレトロウイルスを含有する培地をインキュベートすることを特徴とするレトロウイルスの配置方法。

18. レトロウイルス結合部位を有する機能性物質が、フィブロネクチンのヘパリン－II結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項17記載の配置方法。

19. 標的細胞結合部位を有する機能性物質が、標的細胞と特異的に結合するリガンドである請求項17記載の配置方法。

20. リガンドが、細胞接着性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗体、糖鎖、炭水化物または代謝物である請求項19記載の配置方法。

21. 細胞接着性のタンパク質が、フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドである請求項20記載の配置方法。

22. フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドが、VLA-5および／またはVLA-4への結合領域ポリペプチドである請求項21記載の配置方法。

23. リガンドが、エリスロポエチンである請求項20記載の方法。

24. 機能性物質が固定化されている請求項17～23いずれか1項記載の配置方法。

25. 標的細胞内へのレトロウイルス介在遺伝子導入の実施に使用するためのキットであって、

(a) レトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質および／または標的細胞結合部位を有する他の有効量の機能性物質、

(b) レトロウイルスと標的細胞をインキュベートするための人工基質、および

(c) 上記標的細胞を予備刺激するための標的細胞増殖因子、を含んでなることを特徴とするキット。

26. レトロウイルス結合部位を有する機能性物質が、フィブロネクチンのヘパリン－II結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項25記載のキット。

27. 標的細胞結合部位を有する機能性物質が、標的細胞と特異的に結

合するリガンドである請求項 25 記載のキット。

28. リガンドが、細胞接着性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗体、糖鎖、炭水化物または代謝物である請求項 27 記載のキット。

29. 細胞接着性のタンパク質が、フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドである請求項 27 記載のキット。

30. フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドが、VLA-5 および／または VLA-4 への結合領域ポリペプチドである請求項 29 記載のキット。

31. リガンドが、エリスロポエチンである請求項 28 記載のキット。

32. 機能性物質が固定化されている請求項 25 ～ 31 いずれか 1 項記載のキット。

33. 線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位を有する有効量の機能性物質と接触したレトロウイルスを含有する培地をインキュベートすることを特徴とするレトロウイルスの配置方法。

34. 機能性物質が固定化されている請求項 33 記載の配置方法。

35. レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法において、標的細胞結合部位と線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位またはそれらと機能的な同等物とを同一分子上に有する有効量の機能性物質の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることを特徴とするレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入を向上させる方法。

36. 標的細胞結合部位が、標的細胞と特異的に結合するリガンドである請求項 35 記載の方法。

37. リガンドが、細胞接着性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、

抗体、糖鎖、炭水化物または代謝物である請求項 3 6 記載の方法。

3 8. 細胞接着性のタンパク質が、フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドである請求項 3 7 記載の方法。

3 9. フィブロネクチンの細胞結合領域ポリペプチドが、V L A - 5 および／または V L A - 4 への結合領域ポリペプチドである請求項 3 8 記載の方法。

4 0. リガンドが、エリスロポエチンである請求項 3 7 記載の方法。

4 1. 線維芽細胞増殖因子が、配列表の配列番号 3 で表される線維芽細胞増殖因子、該因子の機能的同等物、および該因子または該因子の機能的同等物を含有するポリペプチドから選択される線維芽細胞増殖因子である請求項 3 5 記載の方法。

4 2. 機能性物質が配列表の配列番号 4 または 5 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項 3 5 記載の方法。

4 3. コラーゲンが V 型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメント、該フラグメントの機能的同等物、および該フラグメントまたは該フラグメントの機能的同等物を含有するポリペプチドから選択されるコラーゲンである請求項 3 5 記載の方法。

4 4. V 型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメントが、配列表の配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するフラグメントである請求項 4 3 記載の方法。

4 5. 機能性物質が配列表の配列番号 7 または 8 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項 3 5 記載の方法。

4 6. 機能性物質が固定化されている請求項 3 5 ～ 4 5 いずれか 1 項記載の方法。

4 7. 機能性物質が固定化されていない請求項 3 5 ～ 4 5 いずれか 1 項

記載の方法。

48. 標的細胞結合部位と線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位またはそれらと機能的な同等物とを同一分子上有する有効量の機能性物を含有するレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入に使用する標的細胞の培養培地。

49. 線維芽細胞増殖因子が、配列表の配列番号3で表される線維芽細胞増殖因子、該因子の機能的同等物および該因子または該因子の機能的同等物を含有するポリペプチドから選択される線維芽細胞増殖因子である請求項48記載の培養培地。

50. 機能性物質が、配列表の配列番号4または5で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項48記載の培養培地。

51. コラーゲンが、V型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメント、該フラグメントの機能的同等物、および該フラグメントまたは該フラグメントの機能的同等物を含有するポリペプチドから選択されるコラーゲンである請求項48記載の培養培地。

52. V型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメントが、配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するフラグメントである請求項48記載の培養培地。

53. 機能性物質が、配列表の配列番号7または8で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項48記載の培養培地。

54. 機能性物質が固定化されている請求項48～53いずれか1項記載の培養培地。

55. 標的細胞結合部位と線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位またはそれらと機能的な同等物とを同一分子上有する有効量の機能性物質と接触したレトロウイルスを含有

する培地をインキュベートすることを特徴とするレトロウイルスの配置方法。

56. 線維芽細胞増殖因子が、配列表の配列番号3で表される線維芽細胞増殖因子、該因子の機能的同等物、および該因子または該因子の機能的同等物を含有するポリペプチドから選択される線維芽細胞増殖因子である請求項55記載の配置方法。

57. 機能性物質が、配列表の配列番号4または5で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項55記載の配置方法。

58. コラーゲンが、V型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメント、該フラグメントの機能的同等物、および該フラグメントまたは該フラグメントの機能的同等物を含有するポリペプチドから選択されるコラーゲンである請求項55記載の配置方法。

59. V型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメントが、配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列を含有するフラグメントである請求項58記載の配置方法。

60. 機能性物質が、配列表の配列番号7または8で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項55記載の配置方法。

61. 機能性物質が固定化されている請求項55～60いずれか1項記載の配置方法。

62. 標的細胞内へのレトロウイルス介在遺伝子導入の実施に使用するためのキットであって、

(a) 標的細胞結合部位と線維芽細胞増殖因子、コラーゲンまたはポリリジン由来のレトロウイルス結合部位またはそれらと機能的な同等物とを同一分子上有する有する有効量の機能性物質、

(b) レトロウイルスと標的細胞をインキュベートするための人工基質、

および

(c) 上記標的細胞を予備刺激するための標的細胞増殖因子、
を含んでなることを特徴とするキット。

63. 線維芽細胞増殖因子が、配列表の配列番号3で表される線維芽細胞増殖因子、該因子の機能的同等物、および該因子または該因子の機能的同等物を含有するポリペプチドから選択される線維芽細胞増殖因子である請求項62記載のキット。

64. 機能性物質が、配列表の配列番号4または5で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項62記載のキット。

65. コラーゲンが、V型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメント、該フラグメントの機能的同等物、および該フラグメントまたは該フラグメントの機能的同等物を含有するポリペプチドから選択されるコラーゲンである請求項62記載のキット。

66. V型コラーゲン由来のインスリン結合部位を含有するフラグメントが、配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するフラグメントである請求項65記載のキット。

67. 機能性物質が配列表の配列番号7または8で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項62記載のキット。

68. 機能性物質が固定化されている請求項62～67いずれか1項記載のキット。

69. 機能性物質がビーズに固定化されている請求項8または46記載の方法。

70. 機能性物質がビーズに固定化されている請求項16または54記載の培養培地。

71. 機能性物質がビーズに固定化されている請求項24、34または

6 1 記載の配置方法。

7 2. 機能性物質がビーズに固定化されている請求項 3 2 または 6 8 記載のキット。

7 3. レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法において、実質的に純粋なフィブロネクチン、実質的に純粋なフィブロネクチンフラグメントおよびそれらの混合物より選択される有効量のビーズに固定化された機能性物質の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることを特徴とするレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法。

7 4. レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法において、実質的に純粋なフィブロネクチン、実質的に純粋なフィブロネクチンフラグメントおよびはそれらの混合物より選択される有効量の固定化されていない機能性物質の存在下で、標的細胞をレトロウイルスで感染させることを特徴とするレトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法。

7 5. 標的細胞が、幹細胞 (stem cells) 、造血細胞、非接着性低密度単核細胞、接着性細胞、骨髓細胞、造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血液細胞、胎児性造血幹細胞、胚形成幹細胞、胚細胞、プライモディアル ジャーム セル (primordial germ cell) 、卵母細胞、卵原細胞、卵子、精母細胞、精子、CD 3 4 + 細胞、C - k i t + 細胞、多能性造血前駆細胞、单能性造血前駆細胞、赤血球系前駆細胞、リンパ球母細胞、成熟血球、リンパ球、B 細胞、T 細胞、線維芽細胞、神経芽細胞、神経細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝細胞、筋芽細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、ガン細胞、骨髓腫細胞及び白血病細胞から選択される細胞である請求項 1 ~ 8 、 3 5 ~ 4 7 、 6 9 、 7 3 および 7 4 いずれか 1 項記載の方法。

76. レトロウイルスが、外来遺伝子を含有するレトロウイルスである請求項1～8、17～24、33～47、55～61、69、71および73～75いずれか1項記載の方法。

77. レトロウイルスが、組換体レトロウイルスベクターである請求項76記載の方法。

78. レトロウイルスが、複製能を欠損した組換え体レトロウイルスベクターである請求項76記載の方法。

79. 請求項1～8、35～47、69および73～78いずれか1項記載の方法で得られる遺伝子導入細胞。

80. 請求項79記載の方法で得られる遺伝子導入細胞を脊椎動物に移植する細胞移植方法。

81. 配列表の配列番号13で表されるポリペプチドまたはその機能的同等物。

82. 請求項81記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

83. 配列表の配列番号17で表される請求項82記載の遺伝子または厳密な条件下で該遺伝子にハイブリダイズし、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドをコードする遺伝子。

84. 配列表の配列番号30で表されるポリペプチドまたはその機能的同等物。

85. 請求項84記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

86. 配列表の配列番号33で表される請求項85記載の遺伝子または厳密な条件下で該遺伝子にハイブリダイズし、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドをコードする遺伝子。

87. 配列表の配列番号5で表されるポリペプチドまたはその機能的同等物。

88. 請求項87記載のポリペプチドをコードする遺伝子。
89. 配列表の配列番号26で表される請求項88記載の遺伝子または厳密な条件下で該遺伝子にハイブリダイズし、レトロウイルスによる標的細胞への遺伝子導入効率を向上させるポリペプチドをコードする遺伝子。

図 1

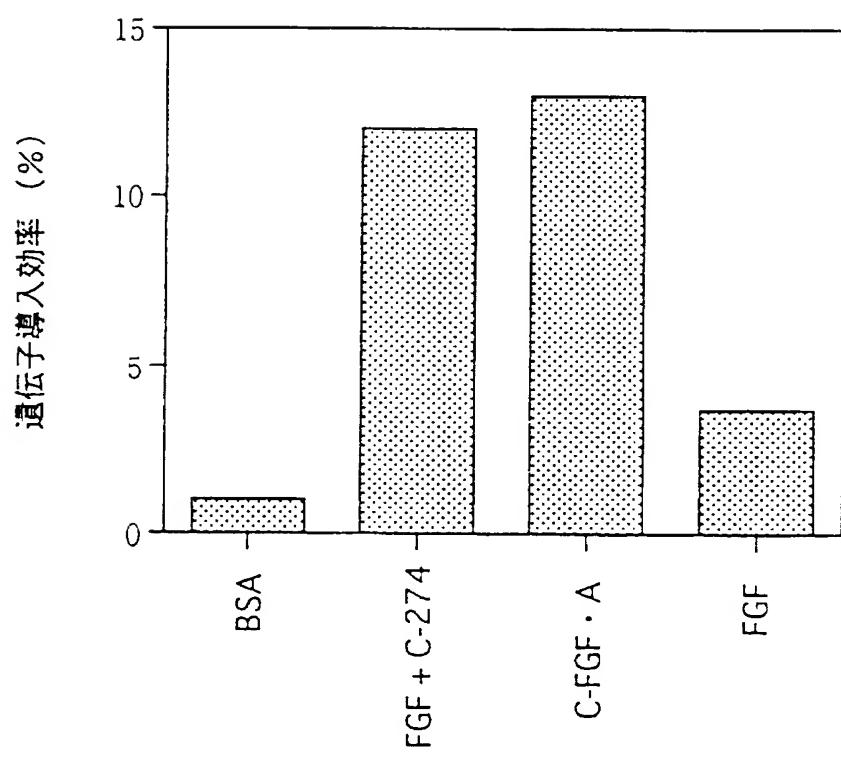


図 2

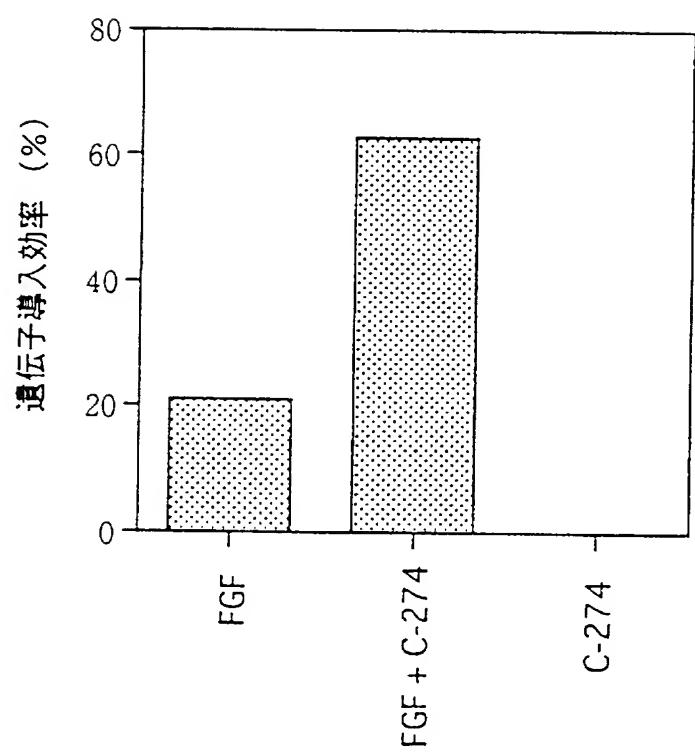


図 3

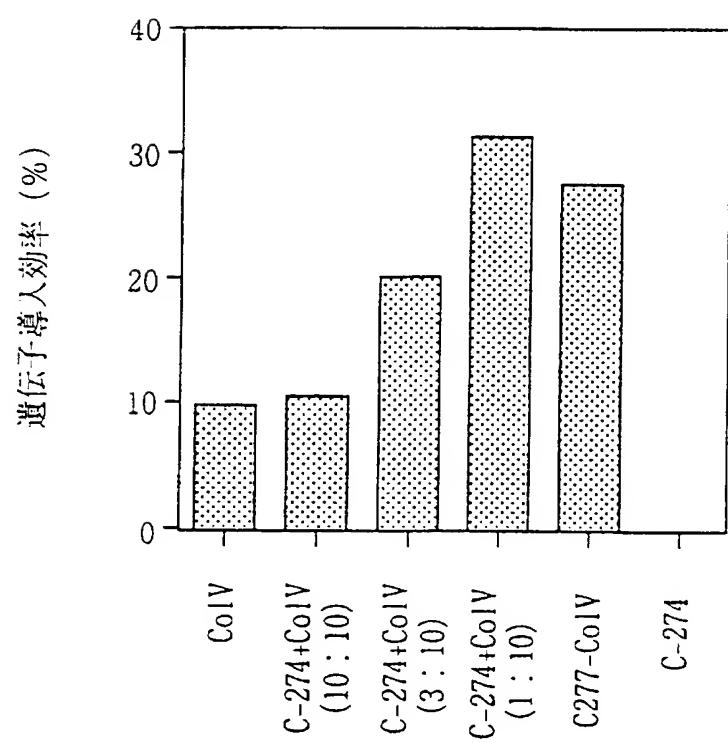


図 4

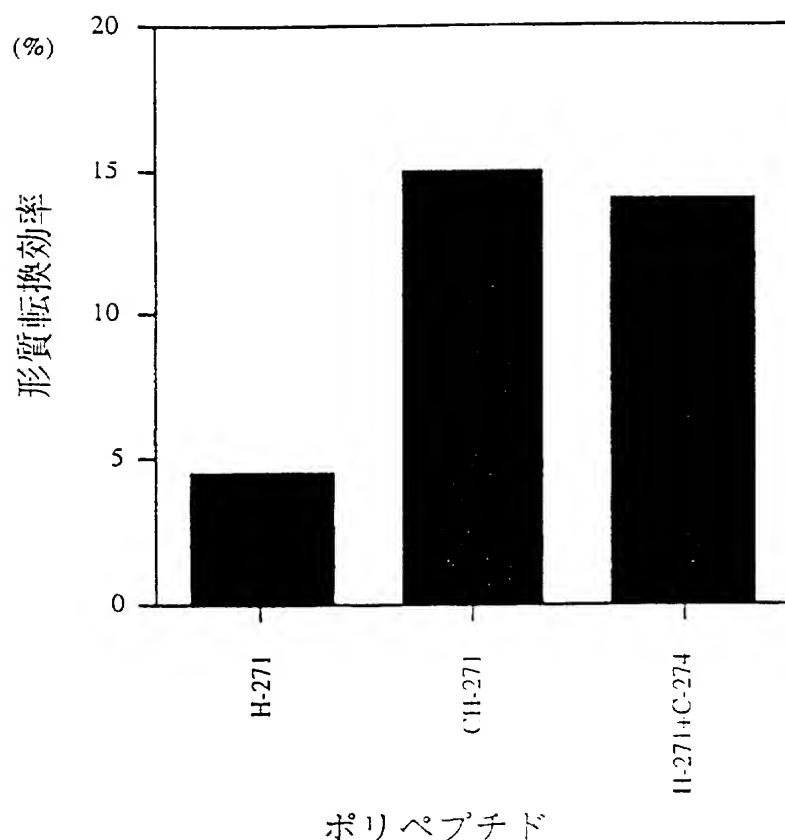


図 5

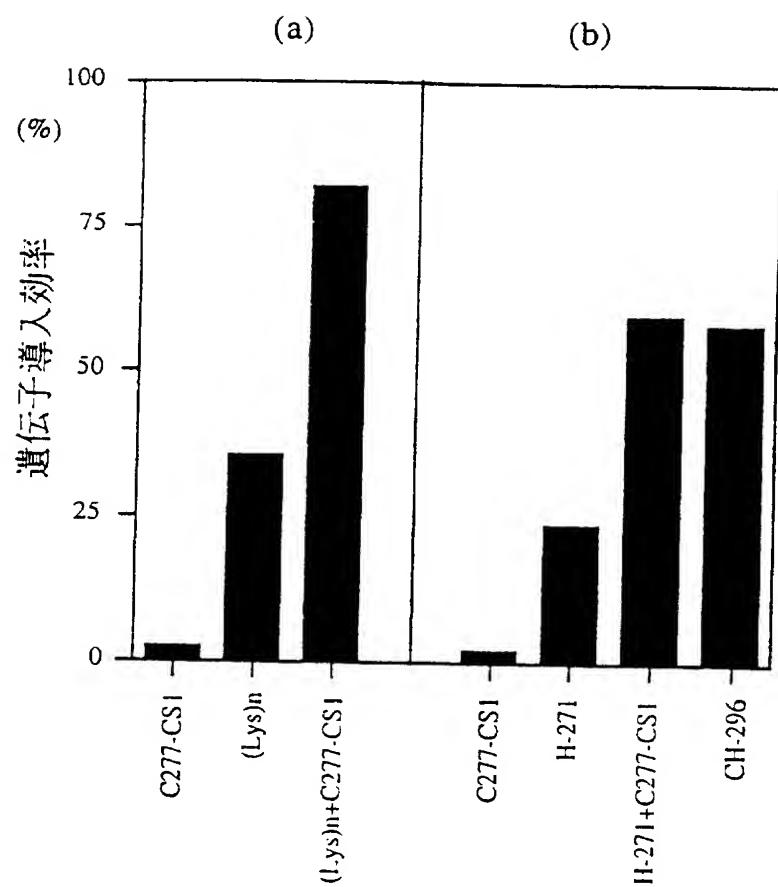


図 6

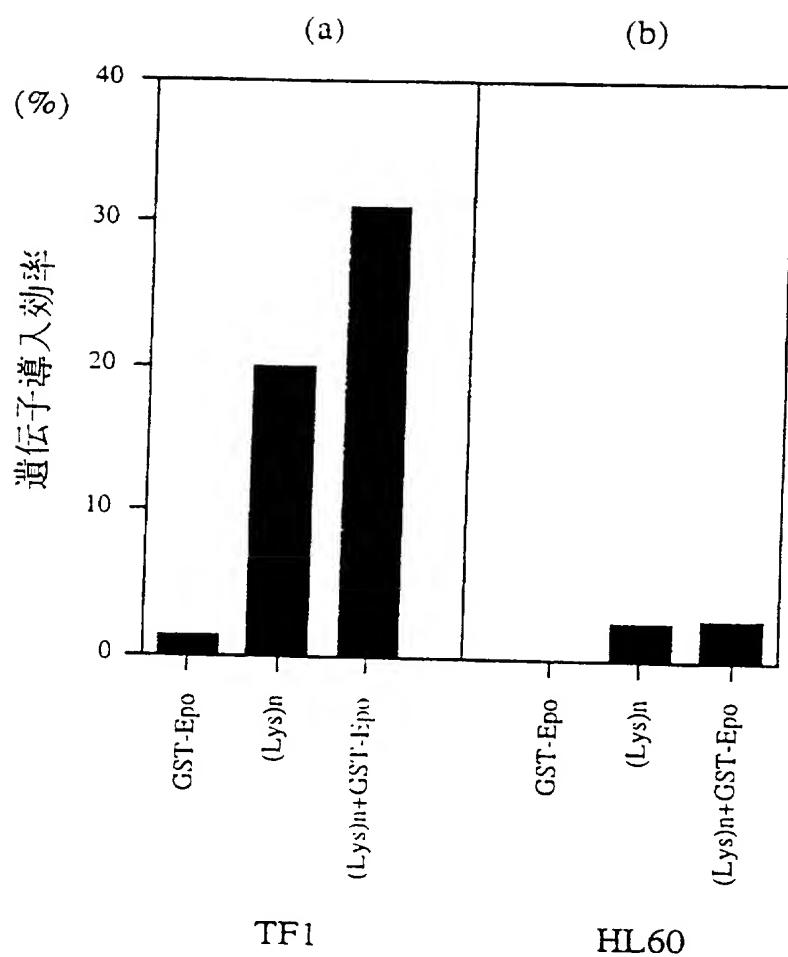


図 7

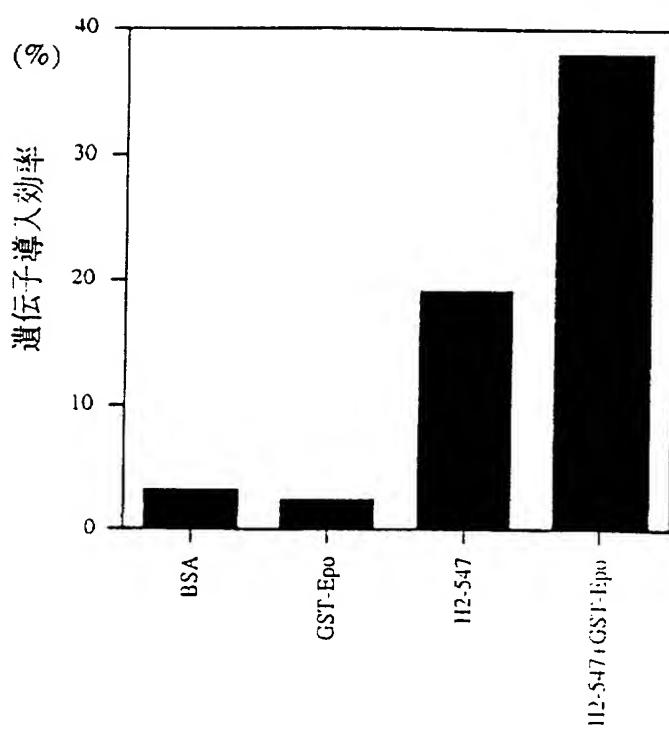


図 8

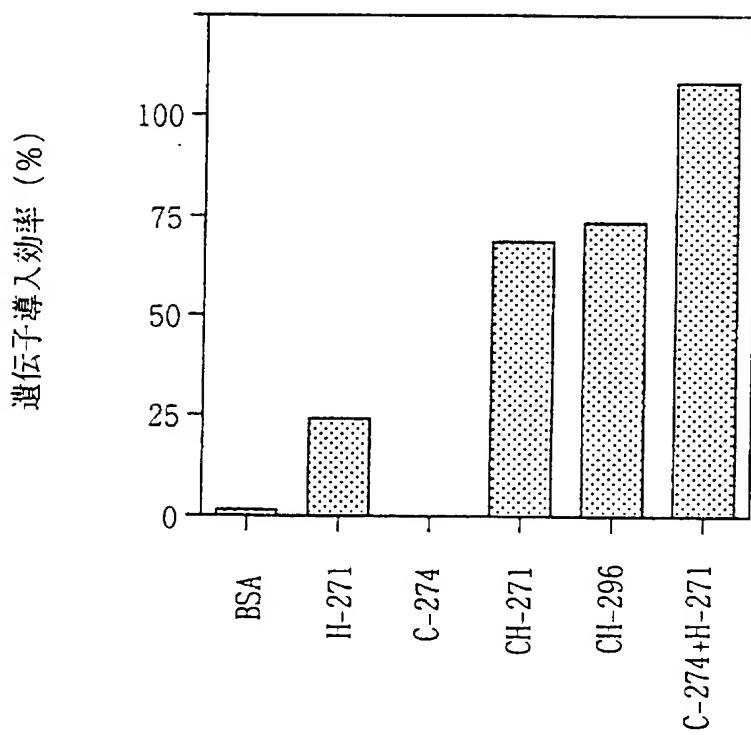
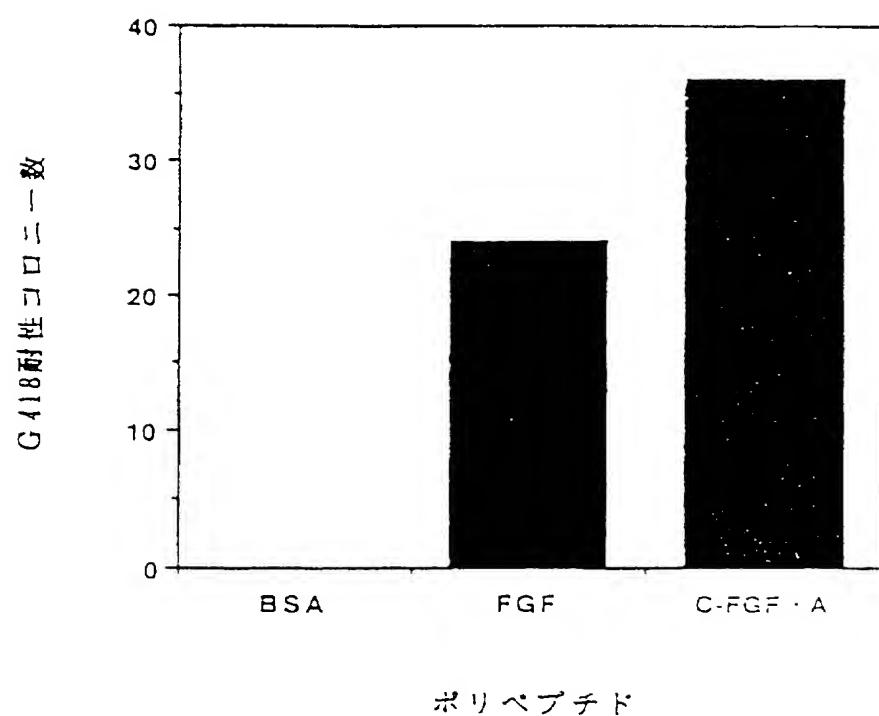


図 9



9 / 26

図10

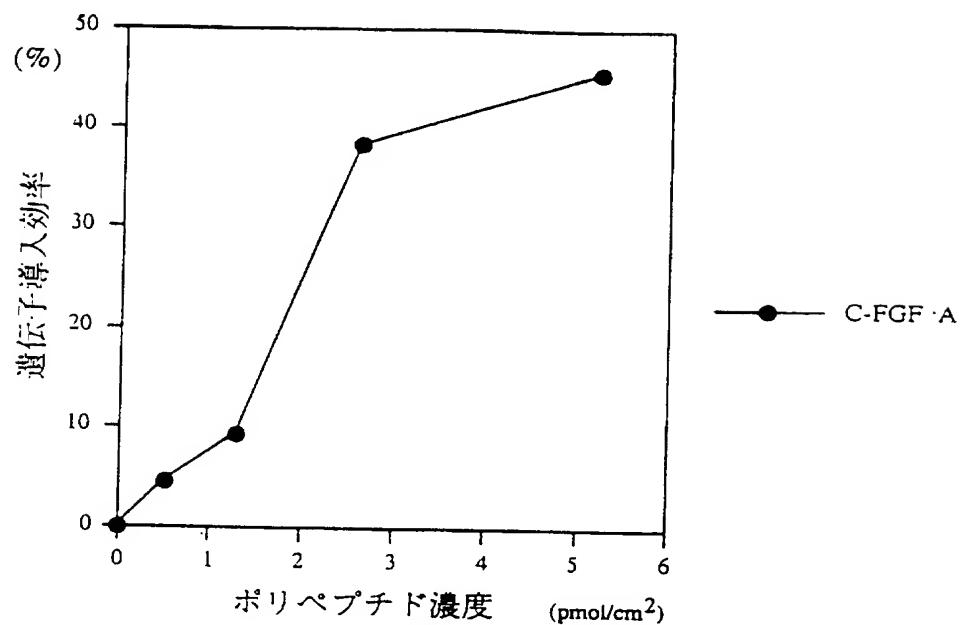


図 1 1

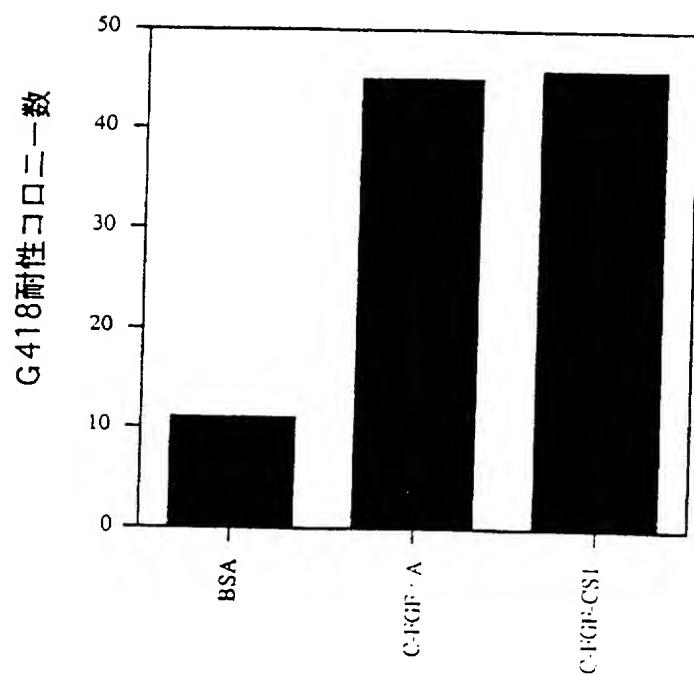


図 1 2

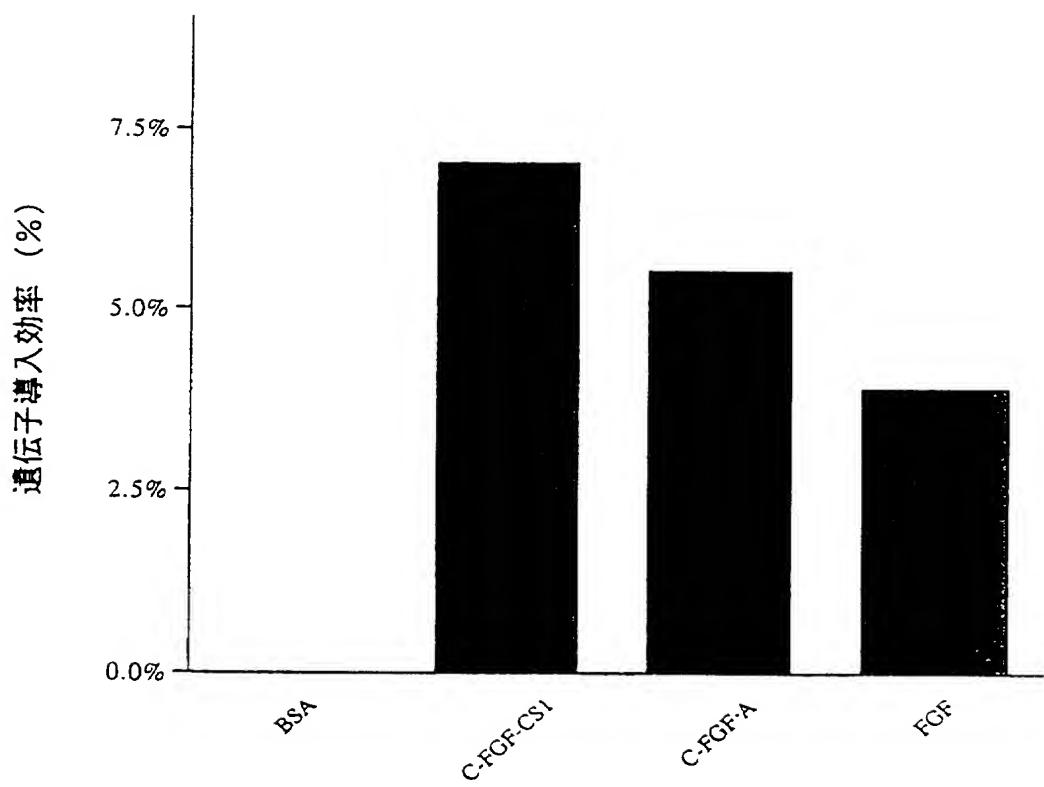
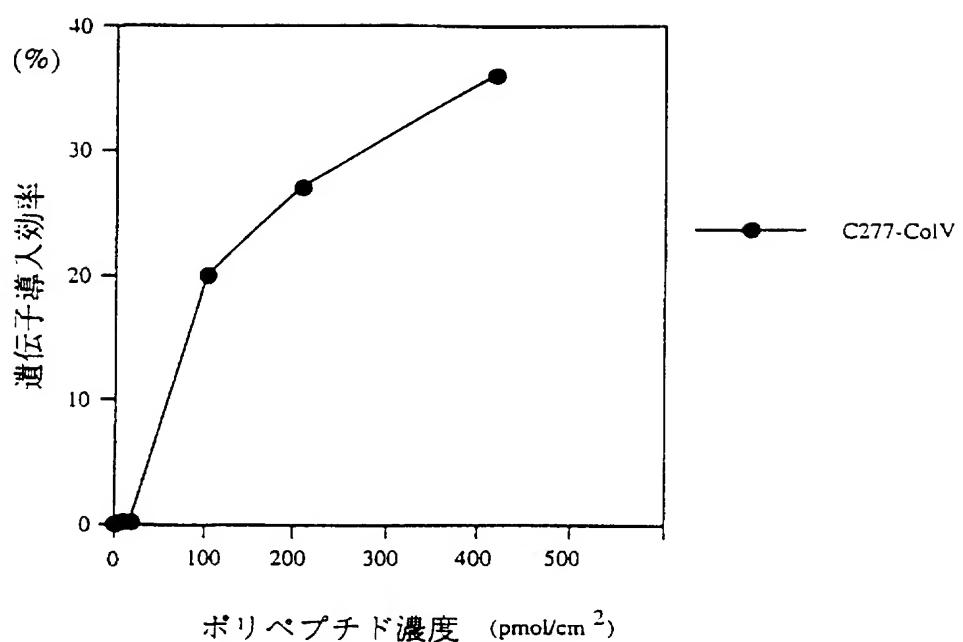


図 1 3



1 3 / 2 6

図 1 4

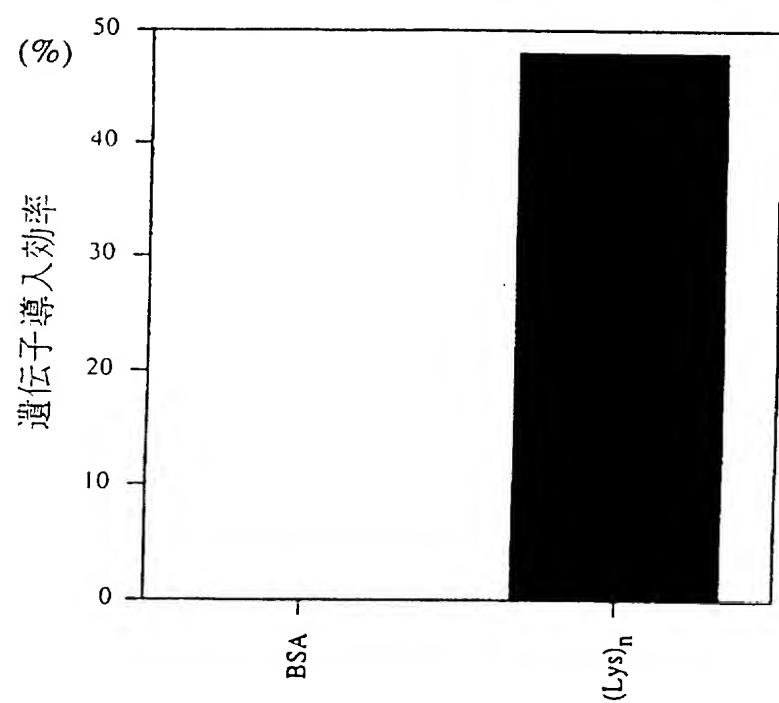


図 15

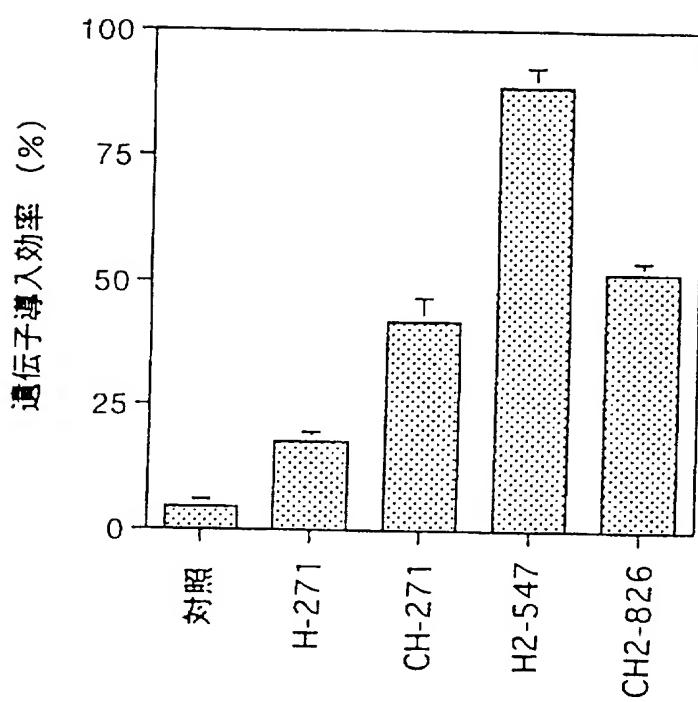


図 16

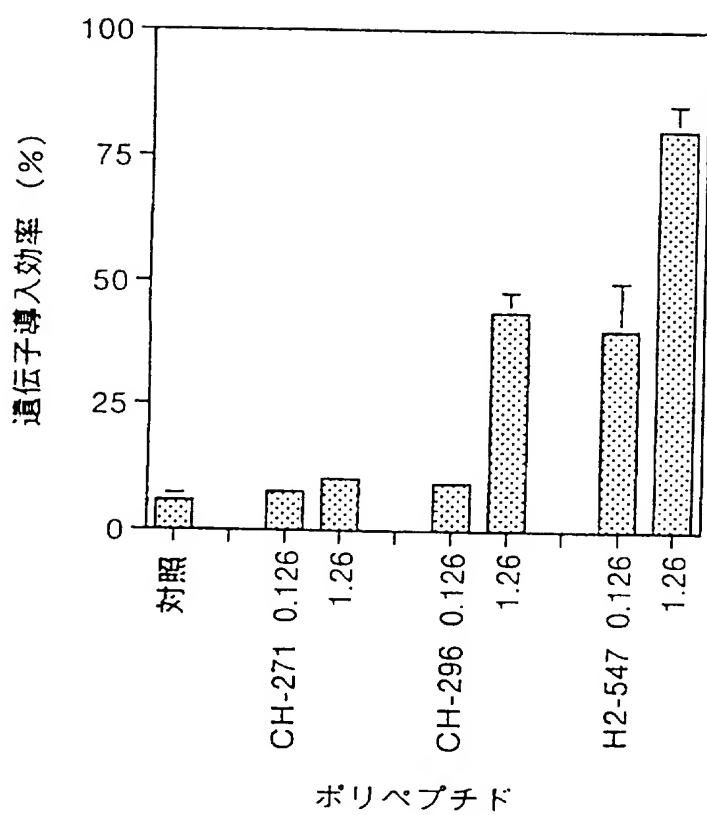


図 1 7

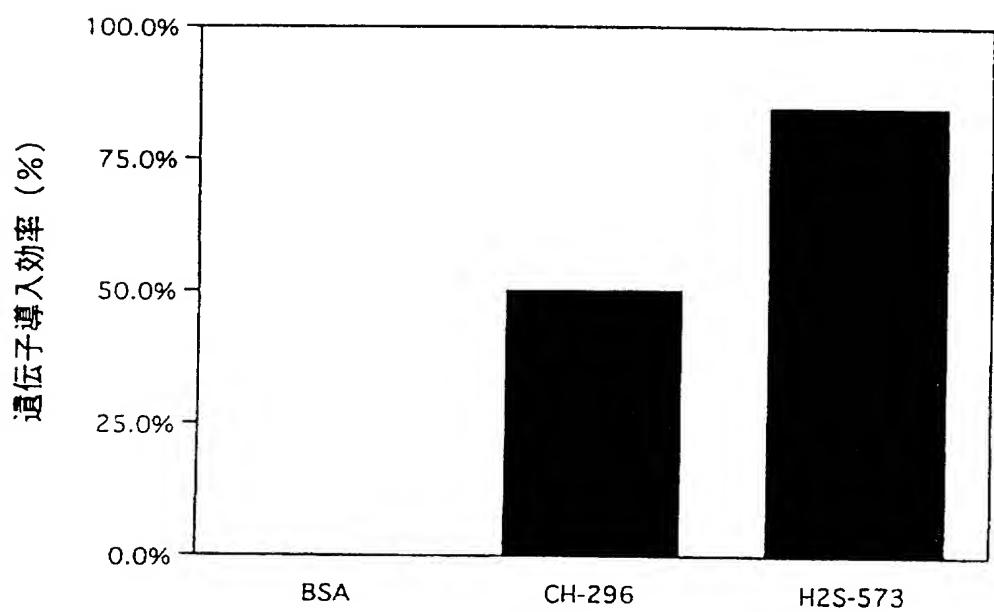
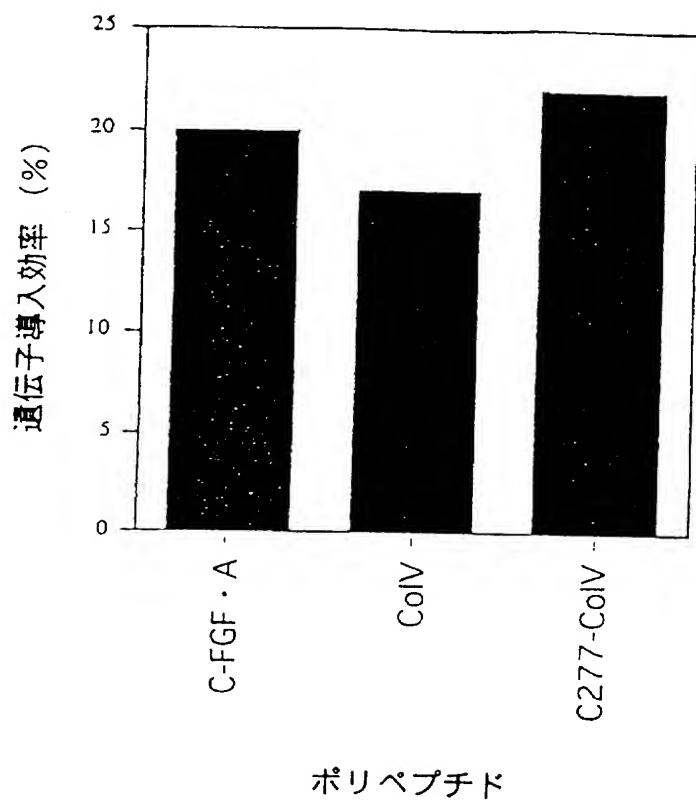


図 18



18 / 26

図19

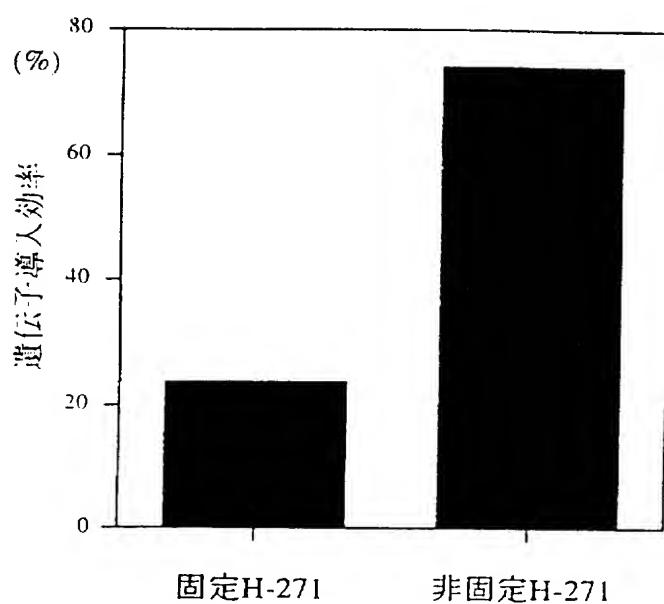
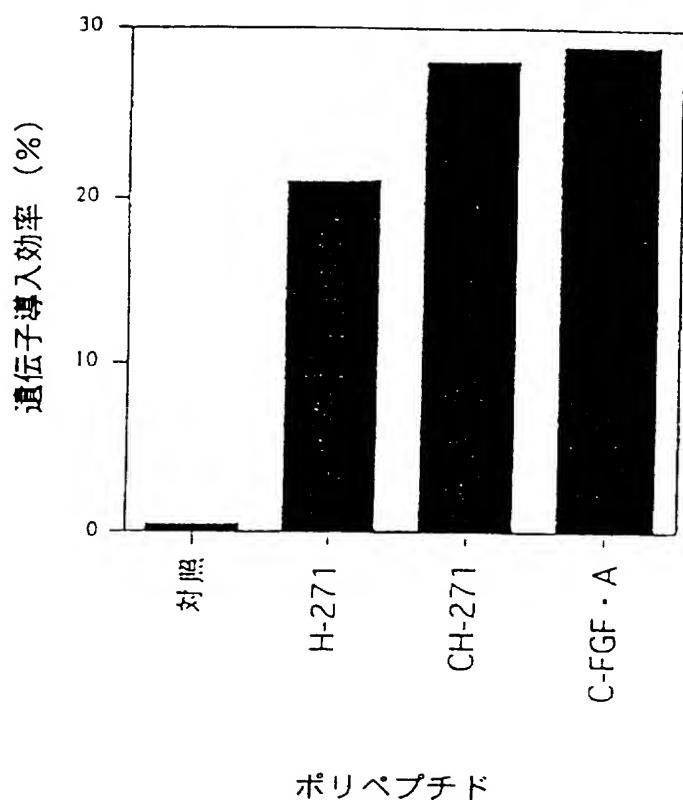


図 20



20 / 26

図21

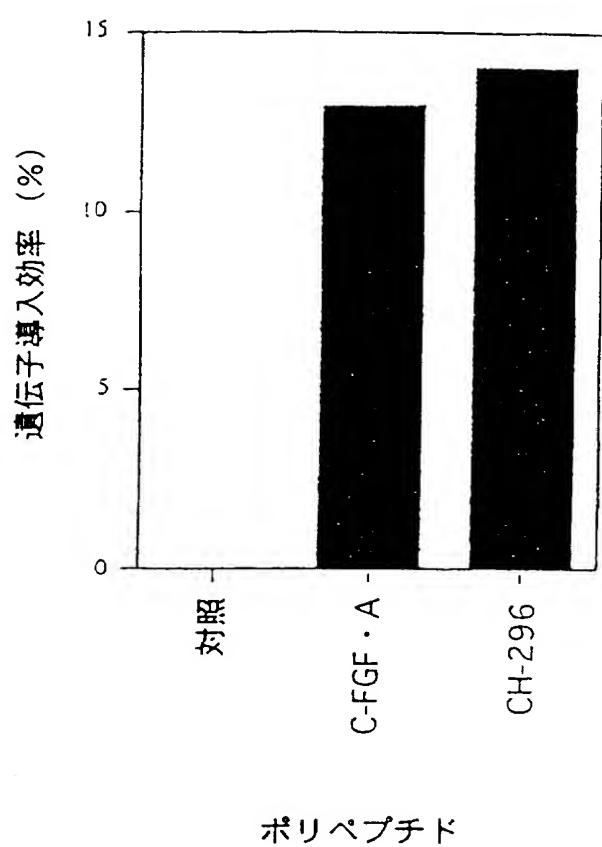


図22

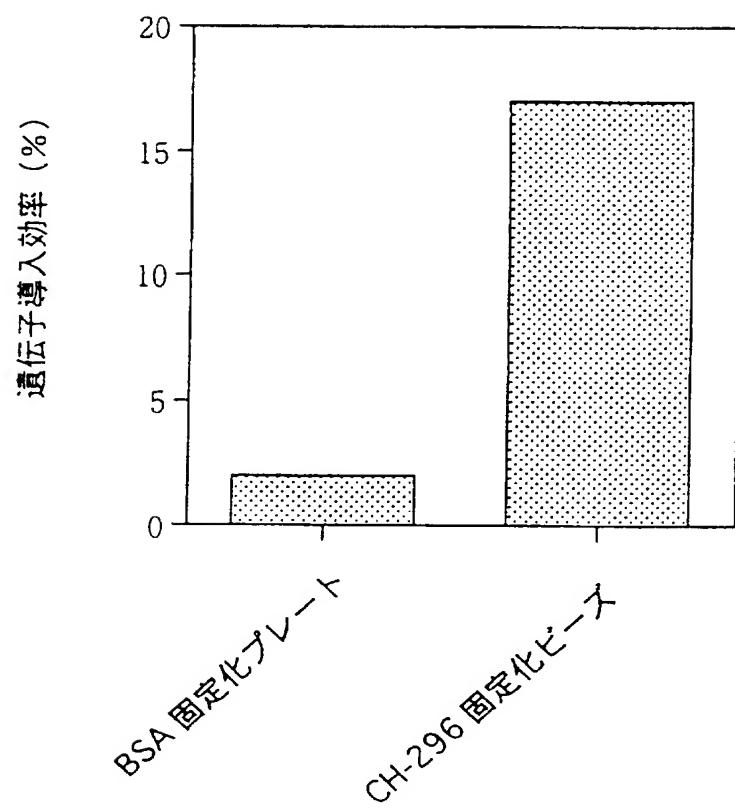


図23

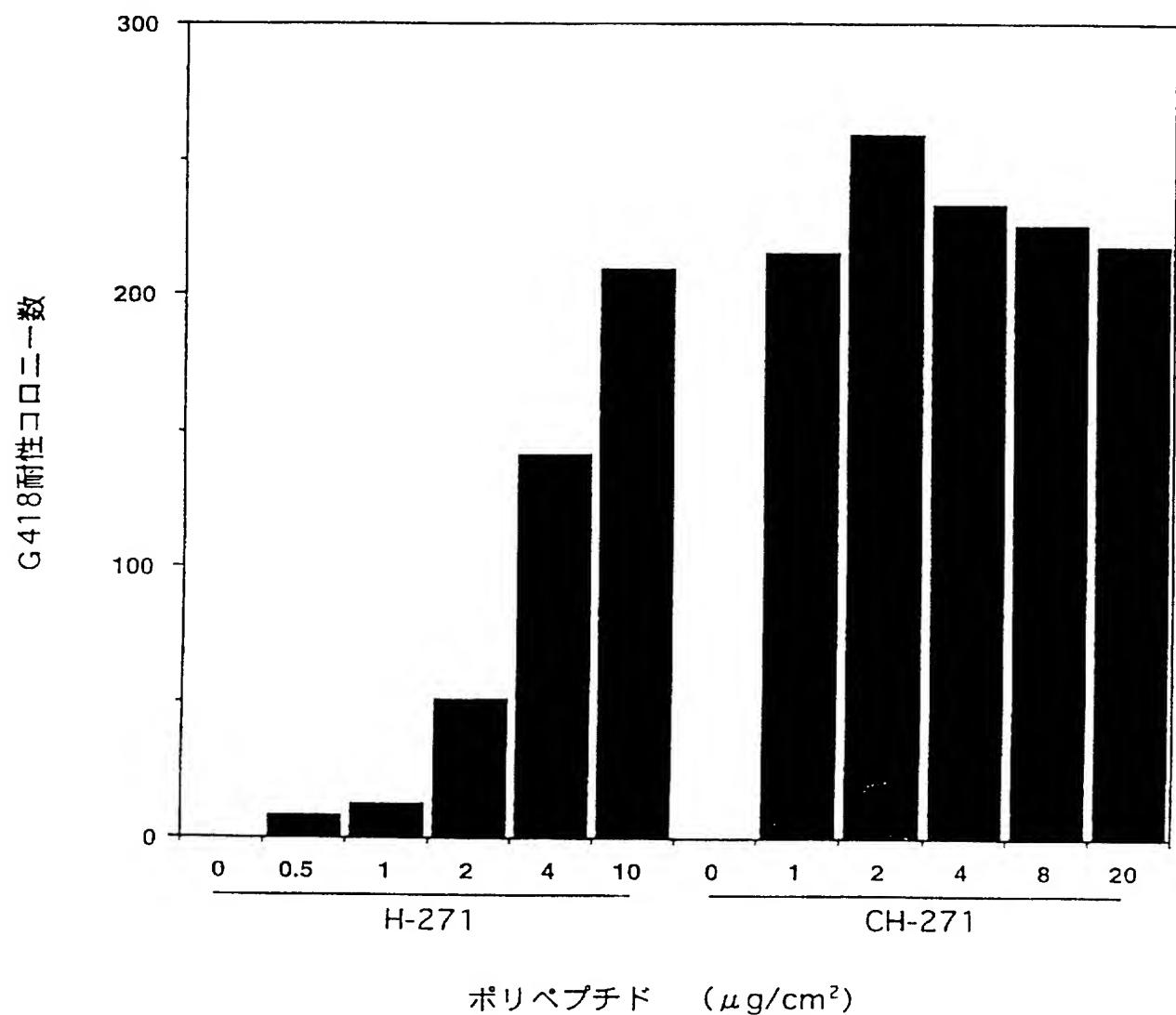
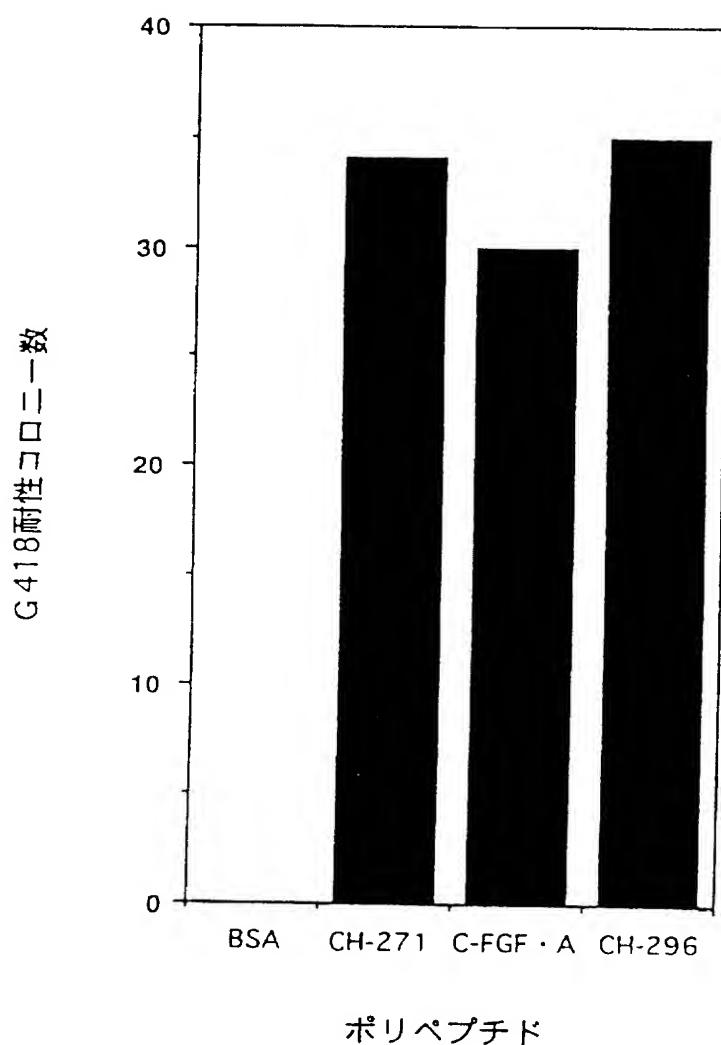


図24



24/26

図 25

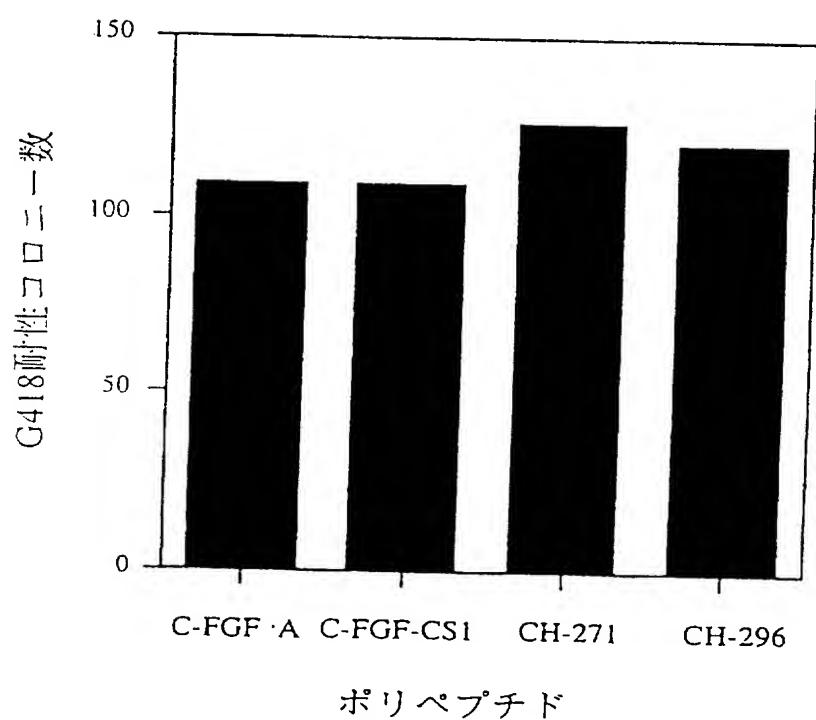
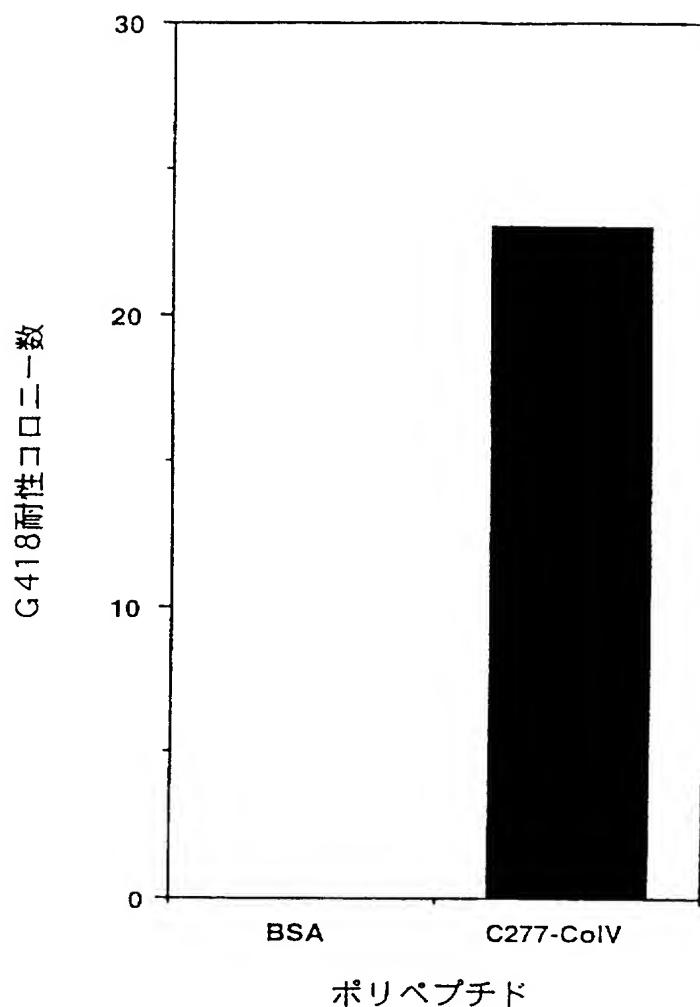


図26



26/26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/86, C12N15/12, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/86, C12N15/12, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSYS, GENETYX-CD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|---|
| X | WO, 92/17210, A (Boehringer Ingelheim International GMBH), October 15, 1992 (15. 10. 92) & DE, 4110409, A & EP, 577648, A & JP, 6-505980, A (Refer to claims 1, 10, 11, 16, 21, 24; pages 23 to 25) | 25-28, 32-37, 43-44, 46-48, 51-52, 54-55, 58-59, 61-62, 65-66, 68-72, 75-80 |
| X | WO, 95/26200, A (Indiana University Foundation) October 5, 1995 (05. 10. 95) | 25-28, 31 |
| A | & AU, 9521979, A (Claim; pages 17, 26 to 28) | 1-24, 29-30, 32-89 |
| A | Blood, Vol. 84(10 Suppl. 1) (1994) E.L.W. Kittler et al. "Enhancement of Retroviral Integration by Cytokine Stimulation Impairs Engraftment of Bone Marrow Cells into Non-Myeloablated Hosts" p. 344a (Refer to column 1360) | 1 - 32 |
| A | Virology, Vol. 194 (1993) Hugo Soudeyns et al. | 1 - 32 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search January 30, 1997 (30. 01. 97) | Date of mailing of the international search report February 12, 1997 (12. 02. 97) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03254

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | "Identification of a Novel Glucocorticoid Response Element within the genome of the Human Immunodeficiency Virus Type 1" p. 758-768 | |
| A | Blood, Vol. 82(11) (1993) Gay M. Crooks et al. "Growth Factors Increase Amphotropic Retrovirus Binding to Human CD34+ Bone Marrow Progenitor Cells" p. 3290-3297 | 1 - 32 |
| A | JP, 62-089699, A (Delta Biotechnology Ltd.), April 24, 1987 (24. 04. 87) & EP, 207751, B & DE, 3675591, G | 81 - 83, 87 - 89 |
| A | JP, 7-504812, A (Scripps Res Inst), June 1, 1995 (01. 06. 95) & WO, 93/11229, A & EP, 61989, A & US, 5492890, A | 84 - 86 |
| A | JP, 63-501953, A (Synergen Inc.), August 4, 1988 (04. 08. 88) & WO, 87/03885, A & EP, 226181, B & US, 5026839, A & US, 4994559, A | 87 - 89 |
| A | Nucleic Acids Res., Vol. 16(8) (1988) Paolella G. et al. "Sequence analysis and in vivo expression show that alternative splicing of ED-B and ED-A regions of the human fibronectin gene are independent events" p. 3545-3557 | 81 - 83 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int C 16 C 12N15/86, C 12N15/12, C 12N5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int C 16 C 12N15/86, C 12N15/12, C 12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSYS, GENETYX-CD

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|--|
| X | WO, 92/17210, A (Boehringer Ingelheim International GMBH) 15. 10月. 1992 (15. 10. 92) & DE, 4110409, A & EP, 577648, A & JP, 6-505980, A (請求項1, 10, 11, 16, 21, 24及び第23-25頁参照) | 25-28, 32-37, 43-4 4, 46-48, 51-52, 54 -55, 58-59, 61-62, 65-66, 68-72, 75-8 0 |
| X | WO, 95/26200, A (Indiana University Foundation) 05. 10月. 1995 (05. 10. 95) | 25-28, 31 |
| A | & AU, 9521979, A (特許請求の範囲、第17、26-28頁) | 1-24, 29-30, 32-89 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

| | |
|---|---|
| 国際調査を完了した日 30. 01. 97 | 国際調査報告の発送日 12.02.97 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 鶴 飼 健 電話番号 03-3581-1101 内線 3449 4B 9453 |

C (続き) . 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | Blood, Vol. 84[10 Suppl. 1](1994) E. L. W. Kittler <i>et al.</i> [Enhancement of Retroviral Integration by Cytokine Stimulation Impairs Engraftment of Bone Marrow Cells into Non-Myeloablated Hosts] p. 344a (1360欄参照) | 1-32 |
| A | Virology, Vol. 194(1993) Hugo Soudeyns <i>et al.</i> [Identification of a Novel Glucocorticoid Response Element within the genome of the Human Immunodeficiency Virus Type 1] p. 758-768 | 1-32 |
| A | Blood, Vol. 82[11](1993) Gay M. Crooks <i>et al.</i> [Growth Factors Increase Amphotropic Retrovirus Binding to Human CD34+ Bone Marrow Progenitor Cells] p. 3290-3297 | 1-32 |
| A | J P, 62-089699, A (Delta Biotechnology Ltd) 24. 4月. 1987 (24. 04. 87) & E P, 207751, B & D E, 3675591, G | 81-83, 87-89 |
| A | J P, 7-504812, A (Scripps Res Inst) 01. 6月. 1995 (01. 06. 95) & WO, 93/11229, A & E P, 61989, A & U S, 5492890, A | 84-86 |
| A | J P, 63-501953, A (Synergen Inc) 04. 8月. 1988 (04. 08. 88) & WO, 87/03885, A & E P, 226181, B & U S, 5026839, A & U S, 4994559, A | 87-89 |
| A | Nucleic Acids Res., Vol. 16[8](1988) Paoletta G. <i>et al.</i> [Sequence analysis and in vivo expression show that alternative splicing of ED-B and ED-A regions of the human fibronectin gene are independent events] p. 3545-3557 | 81-83 |